ENERGETISIERUNG DER FERRICHROMAUFNAHME IN ESCHERICHIA COLI K 12

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
BRUNO EBERSPÄCHER
aus Eßlingen/Neckar

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0070

ENERGETISIERUNG DER FERRICHROMAUFNAHME IN ESCHERICHIA COLI K 12

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
BRUNO EBERSPÄCHER
aus Eßlingen/Neckar

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 7. September 1979

Dekan:	Professor	Dr. F.Oberwinkler
1. Berichterstatter:	Professor	Dr. V.Braun
2. Berichterstatter:	Privatdozent	Dr. K.Hantke

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Volkmar Braun für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Arbeit danken.

Desgleichen gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. P. Overath (Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen) für die Möglichkeit, die Cytochrom-Differenzspektren in seinem Labor aufnehmen zu können und Herrn Dr. T. Anke, der es mir ermöglichte, zelluläre Atmungsaktivitäten in seinem Labor zu messen.

Ganz besonders möchte ich nachstehenden Herren für wertvolle Diskussionsbeiträge bezüglich meiner Arbeit danken:

Dr. K. Altendorf
Dr. R.E.W. Hancock
Dr. K. Hantke
A. Hartmann
S. Hussein
Dr. R.J. Kadner
Dr. H.U. Schairer
Dr. G. Winkelmann
Dr. P. Wookey

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

ALA	δ-Aminolävulinsäure
AP	Acetylphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
cAMP	Adenosin-3',5'-cyclisches monophosphat
EAM	Eisenaufnahmemedium
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FC	Ferrichrom
Gln	Glutamin
G6P	Glucose-6-Phosphat
LPS	Lipopolysaccharid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, reduziert
NTA	Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
pABS	p-Aminobenzoesäure
pHBS	p-Hydroxybenzoesäure
pmf	proton motive force
Pro	Prolin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Chemikalien	4
2.2.	Nährmedien und Puffer	5
2.2.1.	Puffer	5
2.2.2.	Nährmedien	6
2.2.3.	Nährböden	7
2.3.	Glaswaren- und Medienvorbehandlung	8
2.3.1.	Reinigung der Glaswaren	8
2.3.2.	Extraktion von Glucose- und Pufferlösungen	8
2.4.	Versuchsorganismen	8
2.4.1.	Stämme	8
2.4.2.	Isolierung der *hemA*-Mutante	8
2.5.	Anzuchtbedingungen	9
2.5.1.	Aerobes Wachstum	9
2.5.2.	Wachstumsbedingungen zur Reduktion des Cytochromspiegels	9
2.5.3.	Anaerobes Wachstum	10
2.6.	Transportmessungen und Auswertung der erhaltenen Daten	10
2.7.	ATP-Bestimmung	11
2.7.1.	Zellaufschluß	11
2.7.2.	ATP-Messung	12
2.8.	Zellpräparation für Versuche mit Valinomycin	12
2.9.	Colicin Ia	13
2.9.1.	Herstellung von Colicin Ia-Rohextrakt	13
2.9.2.	Test der Aktivität der Colicinpräparation	13
2.10.	Messung des Cytochromspiegels	14
2.11.	Messung von Atmungsraten	14
3.	ERGEBNISSE	15
3.1.	Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Ferrichromaufnahme und auf den Transport von Glutamin und Prolin	15
3.1.1.	Kaliumcyanid (KCN)	15
3.1.2.	Dinitrophenol (DNP)	17

		Seite
3.1.3.	Carbonylcyanid m-chlorphenylhydrazon (CCCP)	17
3.1.4.	Tetrachloro-2-trifluormethylbenzimidazol (TTFB)	19
3.1.5.	Arsenat (AsO_4^{3-})	19
3.1.6.	Wirkung der Hemmstoffe bei Abwesenheit exogener C-Quellen	21
3.2.	Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf den ATP-Spiegel in der Zelle	21
3.2.1.	KCN	21
3.2.2.	DNP	23
3.2.3.	TTFB	25
3.2.4.	Arsenat	25
3.3.	Vergleich der Aufnahmeraten und ATP-Spiegel bei *E.coli AB 2847 WT* und *uncA*-Mutante	26
3.3.1.	Aufnahmeraten	26
3.3.2.	ATP-Spiegel	26
3.4.	Aerober Transport nach anaerobem Wachstum	27
3.4.1.	*AB 2847 WT*	27
3.4.2.	*E.coli K12 EB 53*	28
3.4.3.	Rekonstitution der Transportaktivitäten nach anaerobem Wachstum von *AB 2847 WT* durch aerobes Weiterwachstum	30
3.5.	Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Energetisierbarkeit der Transporte von Pro, Gln und FC in *AB 2847 WT*	30
3.5.1.	Li-Lactat	30
3.5.2.	Succinat	32
3.5.3.	Glycerin	32
3.5.4.	Acetat	33
3.6.	Auswirkungen verschiedener pH-Bereiche auf die Ferrichromaufnahme	35
3.6.1.	Hemmbarkeit der Transportaktivitäten durch Valinomycin bei verschiedenen pH-Werten	35
3.6.2.	Versuche mit Colicin Ia	37
3.6.3.	pH-Abhängigkeit der Ferrichromaufnahme	37
3.7.	Biologische Aktivität von enantio-Ferrichrom	37
3.8.	Bedeutung der Cytochrome für die Ferrichromaufnahme	38
3.8.1.	Eigenschaften der *hemA*-Mutante *EB 53*	39

		Seite
3.8.2.	Korrelation zwischen Transportaktivitäten und Cytochromgehalt	40
3.8.3.	Arsenat-Inhibierung der restlichen Transportaktivitäten in *EB 53* nach Cytochromaushungern	43
3.8.4.	Zusammenhang zwischen Cytochromspiegel und Atmungsraten bei *EB 53*	44
4.	DISKUSSION	47
4.1.	Ferrichromaufnahme im Energetisierungsschema	47
4.2.	Energetisierbarkeit der Ferrichromaufnahme durch verschiedene C-Quellen	49
4.3.	Ferrichromtransport bei verschiedenen pH-Bedingungen	49
4.4.	Stereospezifität des Ferrichromrezeptors	50
4.5.	Bedeutung der Atmungskette für den Ferrichromtransport	51
4.6.	Modellhypothese für die Ferrichromaufnahme in *E.coli*	52
5.	ZUSAMMENFASSUNG	54
6.	LITERATURVERZEICHNIS	55

1. EINLEITUNG

Eisen wird mit Ausnahme der Milchsäurebakterien von allen Mikroorganismen benötigt (67). Sein Einbau erfolgt in Elektronen-Transferproteine wie Cytochrome oder Eisen-Schwefelproteine, in Eisen-Flavoproteine, in Oxygenasen und in Eisen-aktivierte Enzyme wie z.B. die Aconitase. Es liegt in neutraler wässriger Lösung in extrem unlöslicher Form als Aquo-Hydroxo-Polymer vor. Für die Zelle stellt sich das Problem, dieses Eisen für den eigenen Stoffwechsel nutzbar zu machen. Mikroorganismen haben die Fähigkeit, Eisen mittels meist speziesspezifischen Chelatoren zu komplexieren. Alle bekannten aeroben und fakultativ anaeroben Organismen besitzen mehrere Aufnahmesysteme für dieses Element (67). Diese Systeme gliedern sich in zwei allgemeine Gruppen: in eine niedrig-affine oder unspezifische Aufnahme und in eine hoch-affine oder spezifische Aufnahme des Eisens. Bei der ersten Gruppe genügt fast jede anorganische oder organische Eisenverbindung für das Wachstum, wenn sie in genügend großer Menge angeboten wird. Im Gegensatz dazu werden für die hoch-affine Eisenaufnahme spezifische "Carrier"-Moleküle, sogenannte Siderophore, und die dazugehörigen Aufnahmesysteme benötigt.
Bei *Escherichia coli* kennt man z.Zt. drei verschiedene spezifische Eisentransport-Systeme (7, 30), bei denen Fe^{3+} komplexiert wird durch -Citrat
-Enterochelin
-Desferri-Ferrichrom

Darüberhinaus ist eine niedrig-affine Eisenaufnahme möglich, die sich durch Nitrilotriacetat unterdrücken läßt.
Ziel und Zweck der vorliegenden Arbeit war es, die Energetisierung der Ferrichromaufnahme in *E.coli* zu untersuchen.
Über die Kopplung von Transportvorgängen an den Stoffwechsel der Zelle existiert eine Reihe sorgfältiger Untersuchungen bezüglich des Transportes von Aminosäuren (4, 5, 28, 36, 38, 45, 46, 51, 57, 62, 65, 73), von Zuckern und Zuckerderivaten (14, 20, 23, 72) und von Ionen (24, 58, 61, 63) durch biologische Membranen.

Aufgrund dieser und anderer Untersuchungen wurde eine Theorie aufgestellt, wonach aktiver Transport an einen energetisierten Membranzustand gekoppelt ist und/oder Phosphatbindungsenergie erfordert (34). Dieser Membranzustand wird hauptsächlich über die Atmungskette aufgebaut, kann aber auch mittels der membrangebundenen Mg^{2+}-abhängigen ATPase über die Hydrolyse von ATP erzeugt werden.

Mittlerweile wird allgemein angenommen, daß der energetisierte Membranzustand identisch ist mit der "proton motive force" von Mitchell's chemiosmotischer Theorie (34, 60). Diese thermodynamische Größe setzt sich zusammen aus einem elektrischen und einem chemischen Parameter:

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+} = \Delta\psi - \frac{2{,}3RT}{F}\Delta pH$$

$\Delta\psi$ stellt das Membranpotential dar, und ΔpH gibt den pH-Gradienten über die Membran wieder.

Nach Mitchell (53) wird durch atmungsabhängige Substratoxidation und/oder ATP-Hydrolyse ein pH-Gradient über die Membran aufgebaut, wobei Protonen nach außen geschleust werden, das Zellinnere somit alkalischer wird. Gleichzeitig erfolgt dabei eine Ladungstrennung, die den Aufbau eines Membranpotentials (innen negativ) bewirkt.

Die meisten Arbeiten über die Energetisierung aktiver Transportprozesse in Bakterien basieren auf den Arbeiten von Berger und Heppel (5). Diesen Autoren zufolge werden Transportsysteme, die unempfindlich gegenüber osmotischem Schock sind (z.B. Prolin-Transport) über den oben erwähnten energetisierten Membranzustand angetrieben. Schockbare Transportsysteme (z.B. Glutamin-Transport), die periplasmatische Bindeproteine enthalten, benötigen als Energiequelle Phosphatbindungsenergie in Form von ATP oder andere energiereiche Phosphatverbindungen. Lieberman und Hong (51) zeigten, daß für schockbare Transportsysteme zusätzlich zur Phosphatbindungsenergie auch ein funktionelles *ecf-Genprodukt* zur Energetisierung benötigt wird. Plate (57) zeigte, daß für den aktiven Transport von Glutamin in *E.coli* zusätzlich zur Phosphatbindungsenergie auch der energetisierte Membranzustand benötigt wird.

Kurz darauf demonstrierten Hong et al. (36), daß die Glutaminaufnahme abhängig ist von Acetylphosphat, einer energie-

reichen Phosphatverbindung, aber unabhängig von der "proton motive force" und vom *ecf-Genprodukt*.
Die Abhängigkeit des Prolin- und Glutamintransportes von den genannten Energiequellen ist im Schema der Abb.1 wiedergegeben. Die Energetisierung der Ferrichromaufnahme sollte mit diesen beiden Aminosäuren als Kontrollsystemen untersucht werden. Dies sollte Rückschlüsse auf das Vorhandensein des energetisierten Membranzustandes bzw. von Phosphatbindungsenergie unter verschiedenen Bedingungen ermöglichen.

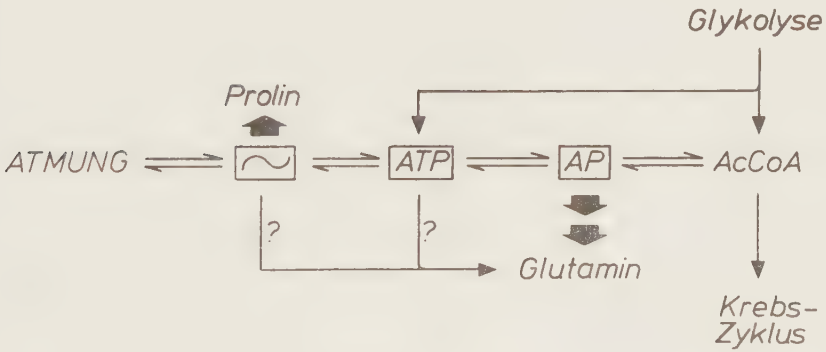

Abb.1: Energetisierungsschema für Prolin- und Glutamintransport.
ATP: Adenosin-5'-Triphosphat
AP: Acetylphosphat
~: Energetisierter Membranzustand ("proton motive force")

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firma Merck AG, Darmstadt.

Von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:
$^{55}FeCl_3$ in 0,1 M HCl (1,01 mCi/ml, 150 µg Fe/ml)
D-(U-^{14}C) Glucose-6-Phosphat, Kaliumsalz (241 mCi/mMol, 197 µCi/ml)
L-(U-^{14}C) Glutamin (49 mCi/mMol, 50 µCi/ml)
L-(G-^{3}H) Prolin (677 mCi/mMol, 1 mCi/ml)

Von Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cali., USA:
Chelex 100

Von Boehringer GmbH, Mannheim:
Adenosin-5'-Triphosphat
Luciferase
Neomycinsulfat

Von Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA:
Bacto-Agar
Bacto-Trypton
Brain Heart Infusion Broth
Yeast-Extract

Von Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg:
Chloramphenicol
Dinitrophenol
Rinderserum Albumin

Von Sigma Chem. Co., St.Louis, Mo., USA:
D-Glucose-6-Phosphat
Mitomycin C
Valinomycin

Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) und Tetrachloro-2-trifluormethylbenzimidazol (TTFB) wurden freundlicherweise von Dr. K.Altendorf, Bochum, zur Verfügung gestellt. Desferri-Ferrichrom wurde dem Bestand des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, entnommen.

2.2. Nährmedien und Puffer

2.2.1. Puffer

CR-Puffer (nach Cohen und Rickenberg):

$K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$	15,7	g/l
KH_2PO_4	3,0	g/l
$(NH_4)_2SO_4$	2,0	g/l

EAM-Puffer:

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,07	g/l
KH_2PO_4	0,68	g/l
$(NH_4)_2SO_4$	0,66	g/l
	0,5 ml 1 M $MgCl_2$/l	
	0,2 ml 0,1 M $caCl_2$/l	

EAM/NTA-Puffer: Wie EAM-Puffer + 10 ml 10 mM NTA (pH 7)/l

M9-Puffer:

Na_2HPO_4	6,0	g/l
KH_2PO_4	3,0	g/l
NaCl	0,5	g/l
NH_4Cl	1,0	g/l

MOPS-Puffer:

Morpholinopropansulfonsäure	2,09	g/l
	10 ml 1 M $MgSO_4$/l	

mit NaOH auf pH 7,4 gebracht

MOPS/EDTA-Puffer:

Morpholinopropansulfonsäure	2,09 g/l
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,46 g/l
EDTA	0,37 g/l

2.2.2. Nährmedien

Minimalmedien:

100 ml	des jeweiligen Puffers
10 ml	TTP (Trp, Tyr, Phe, 1 mg/ml)
2 ml	pABS, pHBS (2 mM)
1 ml	40% Glucose bzw. andere C-Quellen
1 ml	1 M Na-Citrat
1 ml	Thiamindichlorid (1 mg/ml)
1 ml	Spurenelemente
0,5ml	20% Casaminosäuren
0,1ml	1 M $MgSO_4$
0,1ml	1 mM $FeCl_3$/HCl (in der Vorkultur, die über Nacht angezüchtet wurde, ansonsten wurde die Hälfte der angegebenen Menge an Eisen eingesetzt)

Spurenelemente:

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0,3 µM
H_3BO_3	40 µM
$CoCl_2$	3 µM
$CuSO_4$	1 µM
$MnCl_2$	8 µM
$ZnSO_4$	1 µM

TY-Medium:

Bacto-Trypton	8 g/l
Yeast-Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l

2.2.3. Nährböden

TY-Platten:

Bacto-Agar	20 g/l
Bacto-Trypton	8 g/l
Yeast-Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l

Nach dem Autoklavieren wurden evtl. noch Zusätze zugegeben:
20 ml 1,5 mM δ-Aminolävulinsäure pro Liter für das Wachstum von *E.coli EB 53* oder 50 mg Neomycinsulfat (in 5 ml TY-Medium gelöst) pro Liter Medium zur Isolierung dieser hemA-Mutante (Endkonzentration: 50 µg/ml).

M9-Minimalplatten:

8 g Bacto-Agar wurden in 400 ml bidestilliertem Wasser autoklaviert. Anschließend wurden folgende Reagentien zugesetzt:

M9-Puffer	50	ml
TTP (Tyr, Trp, Phe, 1 mg/ml)	50	ml
pABS, pHBS (2 mM)	10	ml
Glucose (40%)	5	ml
oder Succinat (20%)	10	ml
Thiamindichlorid (1 mg/ml)	0,5	ml
$MgSO_4$ (1 M)	0,5	ml
Desferri-Ferrichrom (1 mg/ml)	1	ml

Diese Platten dienten zum Test der *uncA*-Mutante.
M9-Platten mit Succinat als C-Quelle ± ALA (8 ml 1,5 mM pro 400 ml) als Zusatz dienten zum Test der *hemA*-Mutante *EB 53* auf Reversion.

Weich-Agar: 4 g Bacto-Agar wurden in 400 ml bidestilliertem H_2O autoklaviert.

2.3. Glaswaren- und Medienvorbehandlung

2.3.1. Reinigung der Glaswaren

Wenn unter Bedingungen gearbeitet wurde, welche geringe Eisenkonzentrationen erforderten (Transport-Messungen, Zellwachstum), waren sämtliche Glasgeräte zuvor mit ATA (Firma Henkel) gereinigt, mit 10 mM EDTA gespült und mit bidestilliertem Wasser 5 mal nachgespült worden.
Glasküvetten zur ATP-Bestimmung wurden drei Stunden lang bei ca. 80 °C in Königswasser erhitzt, drei Stunden in H_2O erhitzt, 4 mal mit normalem Wasser gespült und 4 mal mit bidestilliertem Wasser nachgespült.

2.3.2. Extraktion von Glucose- und Pufferlösungen

40%ige Glucoselösungen und 10fach konzentrierte Pufferlösungen wurden über Säulen aus Chelex 100 gegeben, um Spuren von Eisen zu entfernen. Die Pufferlösungen wurden im doppelten Volumen aufgenommen und als 5fach konzentrierte Lösungen steril aufbewahrt.

2.4. Versuchsorganismen

2.4.1. Stämme

E.coli K12 AB 2847: aroB, thi, malA, tsx
E.coli K12 AB 2847 uncA: aroB, thi, malA, tsx, uncA
E.coli K12 EB 53: aroB, thi, malA, tsx, hemA
E.coli K12 KH 595: met, pro, λ^+, Colicin Ia-CT2 Erzeuger

2.4.2. Isolierung der *hemA*-Mutante

Von 10 ml einer Kultur von *E.coli AB 2847*, die über Nacht in TY-Medium gezüchtet worden war, wurde folgende Verdünnungsreihe gemacht: 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100.

Je 0,1 ml davon wurden mit dem Drigalski-Spatel auf Neomycin-Platten ausplattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 37 °C wurden kleinere und mittlere Kolonien auf M9-Minimalplatten (+Succinat+ALA) zu Einzelkolonien ausgestrichen. Von 150 Kolonien wurden 7 Kolonien erneut auf M9-Minimalplatten ausgestrichen, davon benötigten 6 Kolonien ALA als zusätzlichen Wachstumsfaktor. Durch Aufnahme von Wachstumskurven, Transportmessungen und Messung des Cytochromspiegels bei anaerob gewachsenen Zellen konnte schließlich gezeigt werden, daß eine Mutante davon, *EB 53*, *hemA*$^-$ war.

2.5. Anzuchtbedingungen

2.5.1. Aerobes Wachstum

Es wurden immer 10 ml des jeweiligen Mediums mit Zellen angeimpft, die auf TY-Vollmediumplatten gewachsen waren. Die Zellen wuchsen über Nacht ca. 19 Std. lang bei 37 °C im Schüttelbad (Vorkultur). Am nächsten Tag wurden diese Zellen geerntet und zum Animpfen der Hauptkultur verwendet, die aus dem gleichen Medium bestand aber mit Fe-extrahierten Puffer- und Glucoselösungen angesetzt worden war. Es wurde auf OD_{578}= 0,01 angeimpft, und die Zellen wurden später bei OD_{578}= 0,2 geerntet. Anschließend wurden sie drei mal mit jeweils 1/10 des ursprünglichen Volumens gewaschen. Dazu wurde der Puffer verwendet, der bei den nachfolgenden Versuchen (Transportbestimmungen, Messung von Cytochromen oder Atmungsraten) benutzt wurde. Zuletzt wurden die Zellen in Puffer in der Hälfte des Ausgangsvolumens aufgenommen und auf Eis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.5.2. Wachstumsbedingungen zur Reduktion des Cytochromspiegels

Eine Kultur von *E.coli EB 53* wurde in M9-Minimalmedium, das mit 12,7 µM ALA supplementiert war, im Schüttelbad bei 37°C über Nacht angezüchtet. Mit diesen Zellen wurde die Hauptkultur, welche aus M9-Minimalmedium (mit 1,27 µM ALA supple-

mentiert) bestand, auf OD_{578}= 0,01 angeimpft und ebenfalls bei 37°C inkubiert. Bei OD_{578}= 0,15 wurden die Zellen geerntet, drei mal mit 1/10 des Ausgangsvolumens an M9-Puffer gewaschen und im ursprünglichen Volumen an M9-Minimalmedium (ohne ALA) resuspendiert. Nach ca. zwei Generationen des Weiterwachstums (OD_{578}= 0,6) waren die Zellen dann ohne meßbare Mengen an Cytochromen.

2.5.3. Anaerobes Wachstum

In diesem Falle wurde die Hauptkultur auf OD_{578}= 0,01 mit Zellen einer aeroben oder anaeroben Vorkultur angeimpft und im GasPak-System der Firma BBL, Division of Becton, Dickinson and Co., Cockeysville, Md., USA auf OD_{578}= 0,2 oder bis zur jeweils angegebenen Trübung angezüchtet (Standkultur).

2.6. Transportmessungen und Auswertung der erhaltenen Daten

Im Transportansatz wurden immer 5 ml EAM-Puffer vorgelegt, die 0,3 mM NTA, 0,3 mM Chloramphenicol, 0,8% (w/v) der jeweiligen C-Quelle (falls nichts anderes angegeben ist) und die entsprechende Konzentration an Hemmstoffen enthielt. Dazu wurden dann 5 ml der doppelt konzentrierten Zellsuspension in EAM-Puffer gegeben und 5 Min. lang bei 37°C im Schüttelbad inkubiert.
Im Falle der Arsenat-Hemmexperimente wurden im Transportansatz 5 ml 75 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7) vorgelegt, der 0,3 mM NTA, 0,3 mM Chloramphenicol, 0,8 mM $MgSO_4$, 0,8% der jeweiligen C-Quelle und die jeweilige Konzentration an Inhibitor enthielt. 5 ml der doppelt konzentrierten Zellsuspension in Tris/HCl-Puffer wurden dann dazugegeben und 15 Min. lang bei 37°C geschüttelt.
Der Transport wurde mit Zugabe von 106,8 µl ^{55}Fe-Ferrichrom (100 µM, 7 µCi/ml), 100 µl ^{3}H-Prolin (1 mM, 10 µCi/ml), 100 µl ^{14}C-Glutamin (1 mM, 5 µCi/ml) oder 100 µl ^{14}C-Glucose-6-Phosphat (20 mM, 12,7 µCi/ml) gestartet. Die Lösung von ^{55}Fe-Ferrichrom wurde erhalten, wenn man 100 µl $^{55}FeCl_3$ mit 6,8 µl einer Lösung von Desferri-Ferrichrom (1 mg/ml) eine Std. lang

bei Raumtemperatur inkubierte.
Im Falle von Ferrichrom und Prolin wurden nach 1, 3, 6, 9, 12 und 15 Min. 1 ml-Proben entnommen und über Zellulosenitrat-Membranfilter (Typ BA 85) der Firma Schleicher und Schüll, Dassel, in einer Absaugvorrichtung der Firma Hölzel-Technik, Dorfen, Obb., abgesaugt. Beim Transport von Glutamin wurden 1 ml-Proben nach 0,5, 1, 2 und 3 Min. und beim Transport von Glucose-6-Phosphat nach 1, 3, 6 und 9 Min. entnommen. Die Membranfilter wurden zwei mal mit je 4 ml einer 0,1 M LiCl-Lösung gewaschen und über Nacht an der Luft getrocknet. Unter Verwendung von je 5 ml Rotiszint-Szintillator-Flüssigkeit der Firma Carl Roth KG, Karlsruhe, wurde im Szintillationszähler Mark II der Firma Nuclear-Chicago, Des Plaines, Ill., USA die Radioaktivität gemessen. Cpm-Werte wurden durch externe Standardisierung bestimmt und auf mg Trockengewicht der jeweiligen Zellsuspension bezogen. Aus den so erhaltenen Transportkinetiken wurden unter Berücksichtigung aller Zeitwerte mit Ausnahme der Zeit t = 0 mittels linearer Regressionsanalyse die Aufnahmeraten errechnet.
Alle Transportversuche wurden mindestens 4 mal durchgeführt, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen.
Zur Korrektur für Transportaktivitäten, die auf endogenen Energiereserven beruhen, wurden jedesmal Transportmessungen auch mit Zellen durchgeführt, die beim Transport keine C-Quelle zugesetzt bekamen.
Die Transport-Messungen wurden zwar unter Bedingungen gemacht, wo kein Wachstum mehr möglich war, es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, daß das ^{55}Fe während der Ferrichromaufnahme aus dem Komplex mobilisiert wird.

2.7. ATP-Bestimmung

2.7.1. Zellaufschluß

2,5 ml der jeweiligen Zellkultur und 2,5 ml des Transportansatzes wurden wie bei Transport-Messungen zusammengegeben und entsprechende Zeit bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 15 ml kochendes bidestilliertes H_2O zugegeben.

Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Uhrglas bedeckt und 60 Min. lang im kochenden Wasserbad inkubiert (90°C). Das Gesamtvolumen wurde dann wieder auf 20 ml gebracht, und die Reaktionskölbchen wurden auf Eis aufbewahrt. Kleine Volumenanteile der einzelnen Proben wurden in Plastikröhrchen mit Schraubverschluß in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -194°C aufbewahrt.

2.7.2. ATP-Messung

ATP-Spiegel wurden im DuPont 760 Luminescence Biometer der Firma DuPont Instruments gemessen (19, 66). Jeweils 90 µl einer Lösung von 11,3 mg Luciferase und 56,3 mg Rinderserum Albumin in 10 ml MOPS-Puffer wurden in den Küvetten vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Injektion von 10 µl des Zellaufschlusses bzw. des ATP-Standards gestartet. Die Hamilton-Spritze, welche zur Injektion verwendet wurde, mußte zwischen den Messungen immer je 1 mal mit 0,2 N HCl, MOPS-Puffer und nachfolgender Probe gespült werden. Als Standard wurde eine 8 mM ATP-Lösung in MOPS/EDTA-Puffer hergestellt.
Jede Messung wurde mit mindestens 4 verschiedenen Zellkulturen durchgeführt. Die erhaltenen ATP-Spiegel wurden für endogene ATP-Mengen korrigiert und geben die ATP-Mengen wieder, die durch Inkubation der Zellen mit Glucose unter den verschiedenen Bedingungen synthetisiert wurden.

2.8. Zellpräparation für Versuche mit Valinomycin

Für Hemmexperimente mit Valinomycin wurden die Zellen wie folgt behandelt (70): Die Zellkultur wurde in der Minifuge 2 der Firma Heraeus Christ abzentrifugiert (4300xg, 10 Min., 4 C) und zwei mal mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,1) von jeweils 1/10 des Ausgangsvolumens gewaschen. Das Sediment wurde dann in 1/50 des Ausgangsvolumens Tris-Puffer aufgenommen und 6 Min. bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Danach wurde dasselbe Volumen einer 20 mM Lösung von EDTA in Tris/HCl zugegeben und weitere 3 Min. bei 37°C im Schüttel-

bad inkubiert. Die Zellen wurden dann mit einer eiskalten Lösung von EAM/NTA (pH 6) 1:10 verdünnt und sofort abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in eiskaltem EAM/NTA-Puffer (1/10 des Ausgangsvolumens) des gewünschten pH-Wertes wurden die Zellen im selben Puffer in der Hälfte des Ausgangsvolumens aufgenommen und für Transport-Messungen verwendet.

2.9. Colicin Ia

2.9.1. Herstellung von Colicin Ia-Rohextrakt

10 ml einer Kultur von *E.coli K12 KH 595* in Brain Heart Infusion Broth (37 g/l) wurden über Nacht unter Inkubation im Schüttelbad bei 37°C bis zu OD_{578}= 6,4 gezüchtet. Ein Liter desselben Mediums wurde damit auf OD_{578}= 0,01 angeimpft und ebenfalls bei 37 C°inkubiert. Nach zwei Stunden (bei OD_{578}= 0,52) wurden die Zellen mit Mitomycin C induziert (2 µg/ml Kulturmedium, in Saline gelöst zugegeben) und nach weiteren 3,5 Std. geerntet. Die Zellkultur wurde in der Sorvall RC2-B Zentrifuge abzentrifugiert (Rotor GS-3, 4230xg, 15 Min., 4°C) und in 5 ml CR-Puffer aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in der "French Pressure Cell Press" der American Instrument Co. bei Cell Pressure 20 000 (= Gage Pressure 1260). Die Zelltrümmer wurden in der Sorvall RC2-B Zentrifuge abzentrifugiert (Rotor SS34, 48 200xg, 45 Min., 4°C). Volumenanteile des Überstandes wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -194°C aufbewahrt.

2.9.2. Test der Aktivität der Colicinpräparation

Von der jeweiligen Colicinpräparation wurde eine Verdünnungsreihe 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000 angesetzt. Auf eine TY-Platte wurde eine Suspension von 0,1 ml *E.coli AB 2847* (stationäre Kultur) in 3 ml Weich-Agar aufgebracht. Jeweils 10 µl der Verdünnungen des Colicin-Rohextraktes wurden auf die Platte aufgetropft, diese wurde dann bei 37°C

im Brutschrank inkubiert. Die nach der oben beschriebenen Methode erhaltenen Colicin-Rohextrakte zeigten eine Aktivität von 1:100 und waren noch schwach aktiv bei 1:1000.

2.10. Messung des Cytochromspiegels

Die einzelnen Zellkulturen wurden 3 mal mit je 1/10 des Ausgangsvolumens an EAM-Puffer gewaschen und in 8 ml EAM-Puffer resuspendiert, sodaß eine Trübung zwischen OD_{578}= 10 und OD_{578}= 50 erhalten wurde. Die Zellen wurden im Sonifier B-12 der Firma Branson Sonic Power, Danbury, USA aufgeschlossen, indem die Zellsuspensionen bei Stufe 7 drei Min. lang in 5 Sek.-Zeitabständen unter Eiskühlung beschallt wurden. Differenzspektren der Zellsuspensionen zwischen 400 nm und 600 nm wurden im Aminco Photometer DW2 der Firma American Instrument Co., Silver Spring, USA gemessen (12, 16, 22). Als Maß der Cytochrommenge diente die Höhe der Soret-Bande bei 425 nm. Der Inhalt der Küvetten wurde mit einigen Kristallen Dithionit reduziert bzw. mit ca. 10 µl 3% H_2O_2 oxidiert.

2.11. Messung von Atmungsraten

Atmungsraten der Zellsuspensionen wurden mit dem Sauerstoffmeßgerät der Firma Bachofer, Reutlingen gemessen (3, 13, 21, 25, 43, 49). Der Nullpunkt der Sauerstoffelektrode wurde mit N_2-gesättigtem Wasser eingestellt, dabei wurde die Elektrodenabweichung ca. 1 Std. lang verfolgt. Der zweite Kalibrierpunkt (100 %) wurde mit O_2-gesättigtem Wasser eingestellt. Die Meßtemperatur betrug 25 °C, wobei die Zellsuspensionen vorher bei dieser Temperatur inkubiert worden waren. Zur Messung der Atmungsaktivität wurden jeweils 3 ml der Zellsuspensionen verwendet. Nach Luftabschluß der Meßzelle wurde die Atmung ca. 5 Min. lang beobachtet, dann wurden 10 µl 40% (w/v) Glucoselösung zugegeben und die Sauerstoffabnahme mit dem Schreiber registriert. Die Sauerstoffkonzentration von O_2-gesättigtem Wasser bei 25 °C betrug 0,253 µMol O_2/ml (3). Dieser Wert wurde für O_2-gesättigte Zellsuspensionen übernommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Ferrichrom-aufnahme und auf den Transport von Glutamin und Prolin

Zur Untersuchung der Energieabhängigkeit von Transportvorgängen in ganzen Zellen gibt es im Prinzip zwei Möglichkeiten:

1) Man hungert die verwendeten Zellkulturen aus mit Entkopplern (z.B. Dinitrophenol) unter definierten Bedingungen, wodurch endogene Energiereserven reduziert werden oder
2) man misst Substrattransport bei Zellen mit und ohne Zusatz einer C-Quelle (z.B. Glucose) und nimmt die Differenz als Maß der Energetisierbarkeit des betreffenden Transportsystems durch die jeweils verwendete C-Quelle.

In dieser Arbeit wurde die zweite Methode verwendet, da Nebeneffekte bei längerer Inkubation der Zellen mit Entkopplern nicht auszuschließen waren (56).

Kriterien für die Wahl der Inhibitorkonzentration, die zu Aussagen über die Energetisierung der Ferrichromaufnahme herangezogen wurde, waren folgende:

1) Prolin- und Glutamintransport mußten dem Energetisierungsmodell entsprechen,
2) die Inhibitorkonzentration während des Transportes sollte möglichst gering sein, um unspezifische Nebeneffekte auszuschließen
3) es mußte eine statistisch eindeutige Aussage möglich sein, d.h. die Standardabweichungen der Aufnahmeraten der Aminosäure-Transportsysteme bei der jeweiligen Inhibitorkonzentration durften sich nicht überlappen. Sämtliche Aussagen stützen sich daher auf mindestens 4 unabhängige Versuche.

3.1.1. Kaliumcyanid (KCN)

KCN hemmt die Cytochromoxidase indem es das oxidierte Häm-Eisen komplexiert und seine Reduktion verhindert (33).
Beim Wildtyp *AB 2847* hemmten 4 mM KCN den Pro-Transport stark (23% Restaktivität) nicht jedoch die FC-Aufnahme und den Gln-Transport (87% bzw. 101%, vgl. Abb.2a).

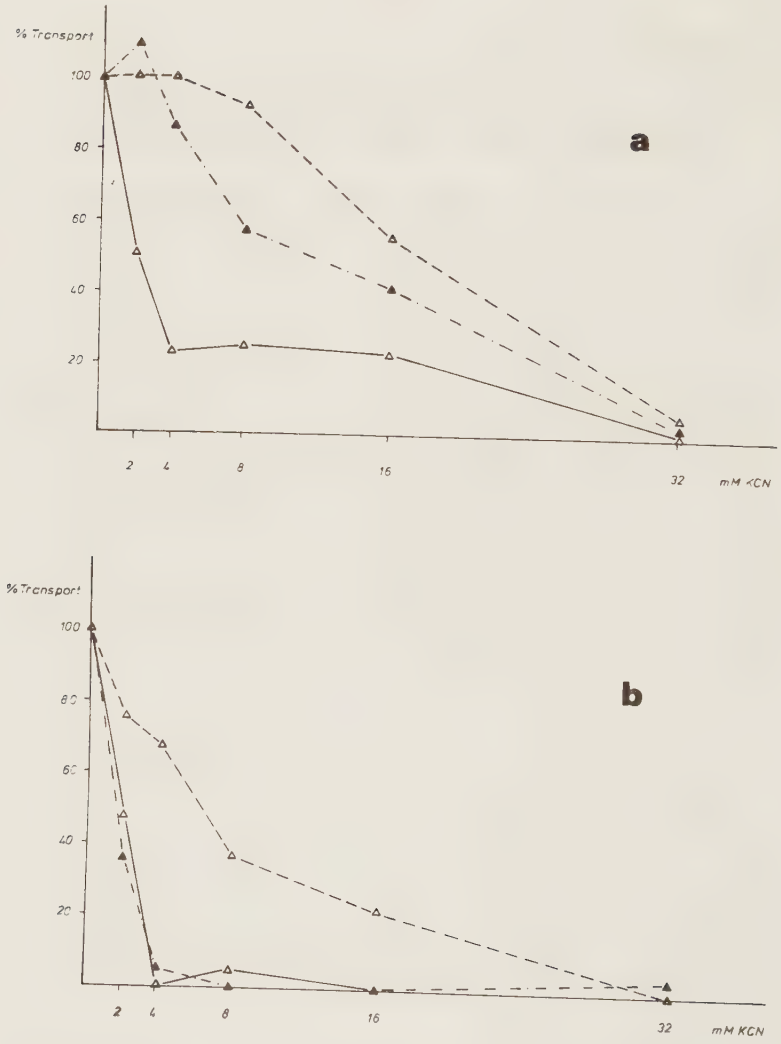

Abb.2: KCN-Hemmung der Transportaktivitäten in *AB 2847 WT* (a) und *AB 2847 uncA* (b).

△– – –△ Gln-Transport

▲ -·-·- ▲ FC-Aufnahme

△ —— △ Pro-Transport

Im Falle der *uncA*-Mutante waren der Pro-Transport und die Ferrichromaufnahme bei 4 mM KCN sehr stark unterdrückt (Restaktivitäten von 0% bzw. 5%), während der Gln-Transport noch immer 68% Aktivität zeigte (Abb.2b).
Diese Ergebnisse deuten auf eine Abhängigkeit der FC-Aufnahme von energiereichen Phosphatverbindungen zusätzlich zur Abhängigkeit vom energetisierten Membranzustand.
Die Resultate bei der *uncA*-Mutante zeigen, daß der Pro-Transport und die FC-Aufnahme wesentlich stärker an diesen Membranzustand gekoppelt sind als der Gln-Transport, welcher unter den genannten Bedingungen hauptsächlich über Acetylphosphat energetisiert zu werden scheint (36).

3.1.2. Dinitrophenol (DNP)

DNP wirkt als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung indem es Membranen durchlässig macht für Protonen (33).
Bei 0,08 mM DNP zeigten die FC-Aufnahme und der Pro-Transport eine Restaktivität von 15% bzw. 32% im *WT*, wieder scheinen beide wesentlich stärker von der "proton motive force" (pmf) abhängig zu sein als der Gln-Transport (89% Restaktivität, s.Abb.3a).
Um eine ähnliche Abnahme der Transportraten zu erhalten wie im *WT*, mußte bei der *uncA*-Mutante eine 10fach höhere Konzentration an DNP eingesetzt werden. Bei 0,08 mM DNP hatte der Pro-Transport eine Restaktivität von 26%, die FC-Aufnahme und der Gln-Transport wiesen noch 56% bzw. 76% Aktivität auf (vgl. Abb.3b). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Stärke der Kopplung der Transporte an den energetisierten Membranzustand wie folgt abnimmt: Pro > FC >> Gln.

3.1.3. Carbonylcyanid m-chlorphenylhydrazon (CCCP)

CCCP ist ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung mit ähnlicher Wirkungsweise wie DNP (33).
Es sollte untersucht werden, ob die geringere Empfindlichkeit der *uncA*-Mutante gegenüber DNP ein allgemeines Phänomen

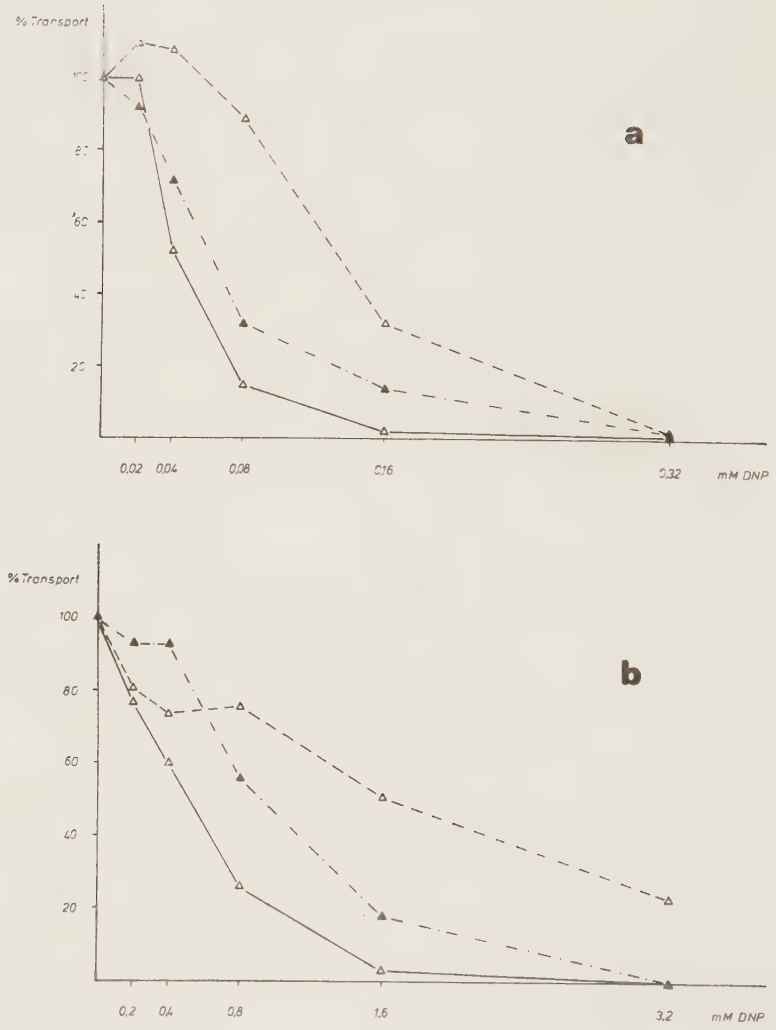

Abb.3: DNP-Hemmung der Transportaktivitäten in *AB 2847 WT* (a) und *AB 2847 uncA* (b).

△———△ Gln-Transport

▲-·-·-▲ FC-Aufnahme

△———△ Pro-Transport

bezüglich Entkopplern darstellt. Die *uncA*-Mutante war CCCP gegenüber sensitiver als der *WT*, es war jedoch mittels dieses Inhibitors keine Unterscheidung möglich zwischen den drei Transportsystemen. Ähnliches hatten auch schon Pugsley und Reeves (58) beobachtet.

3.1.4. Tetrachloro-2-trifluormethylbenzimidazol (TTFB)

Auch TTFB hemmt die oxidative Phosphorylierung als Protonen-Translokator, wobei es ca. 1000 mal effektiver ist als DNP (50). Die Ergebnisse bei 32 µM TTFB entsprachen im Falle des *WT* denen der DNP-Hemmung, die Restaktivitäten von Pro-, FC- und Gln-Transport betrugen 25%, 39% und 63% (s.Abb.4a).
Mit der *uncA*-Mutante wurden bei 8 µM TTFB auch hier ähnliche Ergebnisse wie bei der DNP-Inhibierung erhalten. 2%, 24% und 62% waren die Restaktivitäten für Pro-, FC- und Gln-Transport (Abb.4b). Da auch in diesem Falle, wie bei CCCP, die *uncA*-Mutante gegenüber dem Entkoppler empfindlicher war als der *WT*, scheint die geringere Sensitivität der *uncA*-Mutante gegenüber DNP spezifisch für diesen Inhibitor zu sein. Dies könnte evtl. auf einer veränderten LPS- oder Lipid-Struktur der äußeren Membran beruhen, sodaß DNP weniger gut und erst bei höheren Konzentrationen an seinen Wirkort, die Cytoplasmamembran, gelangt.

3.1.5. Arsenat (AsO_4^{3-})

Arsenat wirkt als Hemmer der Substrat-Phosphorylierung, indem es als Phosphatanalogon von der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase verwendet wird, die Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat verhindert und somit den ATP-Spiegel in der Zelle reduziert (44).
Beim *WT* hemmten 10 µM Arsenat die FC-Aufnahme und den Gln-Transport stark (0% bzw. 5% Resttransport, s.Abb.5a), die Pro-Aufnahme war noch zu 21% aktiv. Daraus folgt, daß die FC-Aufnahme neben dem energetisierten Membranzustand auch Phosphatbindungsenergie braucht.

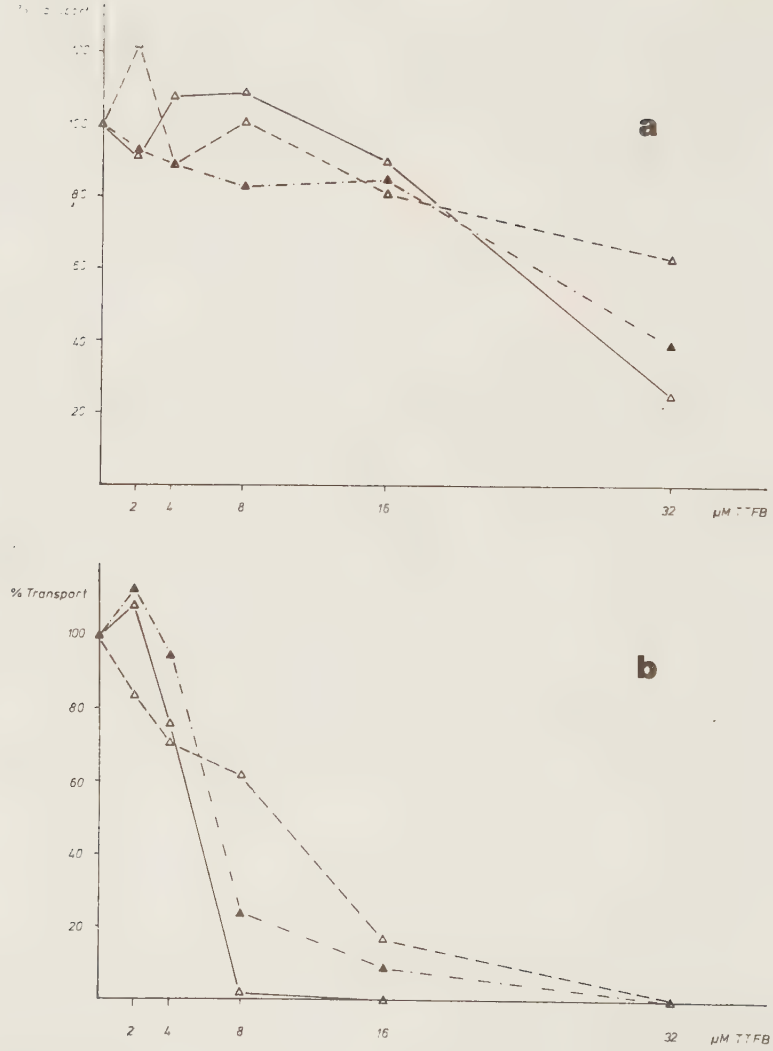

Abb.4: TTFB-Hemmung der Transportaktivitäten in *AB 2847 WT* (a) und *AB 2847 uncA* (b).

△– – –△ Gln-Transport

▲–·–·–▲ FC-Aufnahme

△——△ Pro-Transport

In der *uncA*-Mutante war bei 2 µM Arsenat der Gln-Transport stark inhibiert (25% Restaktivität), während die FC- und Pro-Aufnahme nicht gehemmt waren (85% bzw. 95% Resttransport, vgl. Abb.5b). Dies bedeutet, daß der Eisentransport über das Ferrichromsystem wesentlich stärker an die "pmf" gekoppelt ist als der Gln-Transport und gleichzeitig weniger abhängig ist von energiereichen Phosphatverbindungen.

3.1.6. Wirkung der Hemmstoffe bei Abwesenheit exogener C-Quellen

Wurde die Hemmwirkung zuvor erwähnter Inhibitoren auf den Transport in Zellen untersucht, denen keine exogenen C-Quellen zugegeben worden waren, so zeigte sich mit Arsenat kein Hemmeffekt beim *WT* und mit KCN keine Hemmung bei *WT* und *uncA*-Mutante. Dies bedeutet, daß bei diesen beiden Inhibitoren eine Wirkung auf die Zelle nur bei aktivem Stoffwechsel, d.h. mit zugesetzter Glucose als Energiequelle zu beobachten ist.

3.2. Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf den ATP-Spiegel in der Zelle

Es sollte untersucht werden, ob die Glutamin- und Ferrichromaufnahme abhängig sind vom ATP-Niveau in der Zelle. Dazu wurden bei genau den gleichen Inhibitorkonzentrationen, wie sie beim Transport eingesetzt wurden, die ATP-Spiegel in der Zelle gemessen.

3.2.1. KCN

Im Falle des *WT* stimulierte KCN die ATP-Produktion ganz erheblich, bei 4 mM KCN wurden 191% gemessen und bei 16 mM KCN wurde sogar die dreifache Menge an ATP gefunden, die in nicht-inhibierten Zellen vorlag (s.Abb.6a).
Bei der *uncA*-Mutante stieg der ATP-Spiegel bis auf 159% bei 4 mM KCN, um dann wieder abzufallen (Abb.6b).
Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Kurven der Aufnahme-

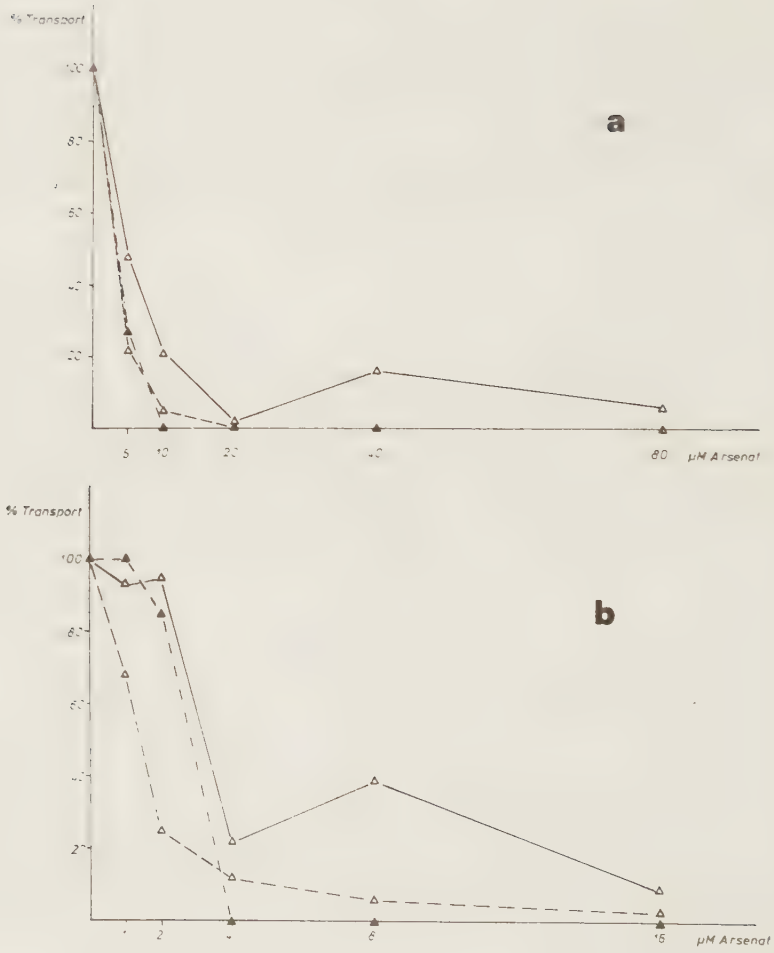

Abb.5: Arsenat-Hemmung der Transportaktivitäten in *AB 2847 WT* (a) und *AB 2847 uncA* (b).

△ – – – △ Gln-Transport

▲ – · – · – ▲ FC-Aufnahme

△ ——— △ Pro-Transport

raten (Abb.2), so läßt sich keine ATP-Abhängigkeit der drei Transportsysteme feststellen. Die hohen ATP-Spiegel bei zunehmender KCN-Konzentration lassen sich wie folgt erklären: KCN inhibiert die Atmungskette, es findet eine Anhäufung von Redoxäquivalenten statt (NADH). Die Zelle stellt sich um auf anaeroben Stoffwechsel, aus Pyruvat wird über Acetyl-CoA unter Bildung von ATP Acetat hergestellt. Gleichzeitig wird Pyruvat bei Verbrauch von 2 Molekülen NADH zu Äthanol metabolisiert. Ein Vergleich der *WT*-Daten von Abb.2 und Abb.6 zeigt überdies, daß es entweder nicht möglich ist, bei höheren KCN-Konzentrationen diese großen Mengen an ATP für die Erhaltung des energetisierten Membranzustandes nutzbar zu machen (d.h. KCN würde dann auch die ATPase hemmen), oder daß KCN einen direkten Einfluß auf die Kopplung der Transportsysteme an den energetisierten Membranzustand hat, sodaß die "proton motive force" zwar existiert, aber nicht mehr für die Energetisierung der Transporte zur Verfügung steht.

3.2.2. DNP

Bei 0,08 mM DNP lagen noch 87% der ursprünglichen Menge an ATP im *WT* vor, die dann bei 0,32 mM DNP auf 0% abfielen (Abb.6a). Bei der *uncA*-Mutante lagen bei 0,8 mM DNP nur noch 21% der Ausgangsmenge an ATP vor (Abb.6b).
Auch hier läßt sich beim Vergleich mit den Transportkurven (Abb.3) keine Limitierung der Transportsysteme durch ATP feststellen.
Beim *WT* läßt sich die Abnahme des intrazellulären ATP-Spiegels mit zunehmender DNP-Konzentration dadurch erklären, daß eine verstärkte ATP-Hydrolyse stattfindet, wodurch die Zelle versucht, dem Abbau des energetisierten Membranzustandes entgegenzuwirken.
Das rapide Absinken des ATP-Niveaus mit steigender DNP-Konzentration in *AB 2847 uncA* ist nicht erklärbar mit der Entkopplereigenschaft von DNP, unter der Voraussetzung, daß die *uncA*-Mutation nicht voll ausgeprägt gewesen war (vgl. TTFB-Kurve). Ebenso ist es unwahrscheinlich, daß DNP die Glucoseaufnahme der Zelle hemmt und somit kein ATP mehr produziert

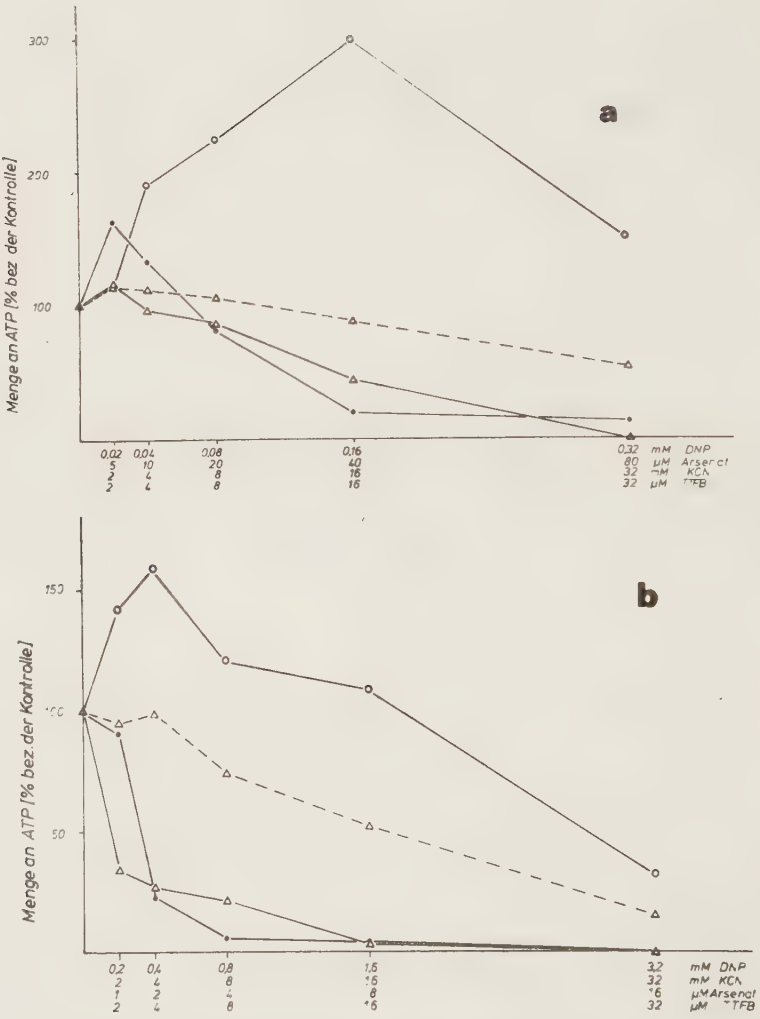

Abb.6: Wirkung verschiedener Inhibitoren auf den ATP-Spiegel in *AB 2847 WT* (a) und *AB 2847 uncA* (b).

○——○ KCN △——△ DNP

●——● Arsenat △- - -△ TTFB

werden kann. Dies müßte sich dann auch in den jeweiligen Transportkurven niederschlagen (vgl. jedoch Abb.3b). Ohki (56) diskutiert einen Hemmeffekt von DNP auf die Adenylatcyclase in *E.coli*, wonach dies zu verringerten cAMP-Mengen in der Zelle führen würde. Es wäre durchaus denkbar, daß sich dadurch drastische Änderungen im Stoffwechsel der Zelle ergeben, die sich letzten Endes bei der *uncA*-Mutante in einem geringeren ATP-Spiegel der Zelle bemerkbar machen.

3.2.3. TTFB

Der *WT* zeigt ein leichtes Ansteigen der ATP-Konzentration auf 114% bei 2 µM TTFB, um dann auf 53% bei 32 µM TTFB abzufallen (Abb.6a).
In der *uncA*-Mutante findet man bei 8 µM TTFB noch 74% des Anfangswertes an ATP, welcher dann auf 15% bei 32 µM TTFB abfällt (Abb.6b).
Wiederum zeigt der Vergleich mit den entsprechenden Transportergebnissen der *uncA*-Mutante, daß ATP nicht limitierend ist für die Funktionsfähigkeit der beobachteten Transporte.

3.2.4. Arsenat

Beim *WT* bewirkte Arsenat ein Ansteigen des ATP-Niveaus auf 163% bei 5 µM Arsenat, welches dann bis 80 µM Arsenat auf 13% absank (Abb.6a). In der *uncA*-Mutante war eine drastische Abnahme auf 23% bei 2 µM Arsenat zu beobachten mit weiterer Reduzierung bei höherer Arsenat-Konzentration (Abb.6b).
In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen sind auch hier die gemessenen ATP-Spiegel nicht ohne weiteres mit den Aufnahmeraten der Transportsysteme bei den jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen korrelierbar (s.Abb.5).
Die höheren ATP-Mengen bei 5 µM und 10 µM Arsenat im Falle des *WT* könnte man dadurch erklären, daß bei diesen Hemmstoffkonzentrationen eine verstärkte Atmung einsetzt, um den Verlust an ATP durch erhöhte oxidative Phosphorylierung auszugleichen (Aufhebung der Atmungskontrolle (11)). Dabei kommt es dann

zu der beobachteten Zunahme des ATP-Spiegels.

3.3. Vergleich der Aufnahmeraten und ATP-Spiegel bei *E.coli AB 2847 WT* und *uncA*-Mutante

3.3.1. Aufnahmeraten

Die Ferrichromaufnahme in der *uncA*-Mutante zeigte 62% der Aktivität vom *WT*, ebenso war der Gln-Transport mit 78% weniger aktiv als beim *WT*. Der Prolintransport war beim *WT* und bei der *uncA*-Mutante gleich aktiv (vgl. Tab.1). Da der Pro-Transport normalerweise als Indikator für das Vorhandensein der "proton motive force" dient (57), deutet dies darauf hin, daß die "pmf" in der *uncA*-Mutante wie im *WT* voll aufgebaut ist. Die niedrigeren Aufnahmeraten der beiden anderen Transportsysteme könnten dadurch zustande kommen, daß in der *uncA*-Mutante geringere Mengen an Acetylphosphat oder anderen energiereichen Phosphatverbindungen vorliegen. Der Grund dafür könnte eine verstärkte Glykolyse sein, deren Endprodukt Acetyl-CoA vor allem in den Krebs-Zyklus fließt, um mehr Redoxäquivalente für eine verstärkte Atmungsaktivität zur Verfügung zu stellen.

3.3.2. ATP-Spiegel

Die *uncA*-Mutante zeigte die dreifache Menge an ATP verglichen mit dem *WT* (s.Tab.2). Dies rührt daher, daß in der *uncA*-Mutante die Glykolyse in verstärktem Maße ablaufen muß, um den Verlust der oxidativen Phosphorylierung wettzumachen. Andererseits wird in dem *uncA*-Stamm, der einen Defekt im F_1-Teil der ATPase hat, kein ATP zum Aufbau des energetisierten Membranzustandes verwendet (29, 57).

Tab.1: Aufnahmeraten bei Glucose-stimuliertem Transport

Die Aufnahmeraten sind zusammen mit ihren Standardabweichungen angegeben in $\frac{ngAtom}{min \cdot mgTG}$ bzw. $\frac{nMol}{min \cdot mgTG}$. Die Zahlen in Klammern bedeuten die Anzahl der Bestimmungen.

Transport	*AB 2847 WT*	*AB 2847 uncA*	% Transport in *uncA* rel. zum *WT*
Ferrichrom	0,039±0,016(17)	0,024±0,021(14)	62
Prolin	0,148±0,033(17)	0,149±0,070(14)	101
Glutamin	2,100±0,860(16)	1,640±0,820(14)	78

Tab.2: Menge an ATP, das durch Inkubation mit Glucose synthetisiert wurde

Die Angaben erfolgen zusammen mit den Standardabweichungen in $\frac{nMol\ ATP}{mgTG}$. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Bestimmungen wieder.

AB 2847 WT	0,55±0,20 (16)
AB 2847 uncA	1,62±0,32 (15)

3.4. Aerober Transport nach anaerobem Wachstum

3.4.1. *AB 2847 WT*

WT-Zellen, die anaerob angezüchtet wurden, zeigten erst bei einer optischen Dichte von 0,80 eine Aufnahme von Ferrichrom (s.Abb.7a). Der Gln-Transport war schon bei OD_{578}= 0,09 voll entwickelt. Der Pro-Transport war bei OD_{578}= 0,60 auf fast maximalem Niveau, d.h. die Zellen waren voll energetisiert,

bevor eine Aufnahme von Ferrichrom zu beobachten war, welche jedoch nur ca. 25% der Transportaktivität bei aerob gewachsenen Zellen entsprach. Es ist denkbar, daß nach längerem anaeroben Wachstum ein Mangel an Fe(II) auftritt und die Zellen zu diesem Zeitpunkt das Ferrichromaufnahmesystem induzieren, sodaß auch restliches Fe(III) der Zelle zugeführt werden kann. Es ist auch denkbar, daß der FC-Transport nur in Gegenwart einer Eisen-Reduktase abläuft, die das Eisen mittels Reduktion zu Fe(II) aus dem Chelat mobilisiert (10, 15). Man könnte postulieren, daß die Synthese dieses Enzyms in Gegenwart von Fe(II)-Ionen reprimiert wird. Eine Abnahme der Fe(II)-Konzentration während des anaeroben Wachstums könnte dann dazu führen, daß die Reduktase wieder synthetisiert wird, und somit wieder aerobe FC-Aufnahme gemessen werden kann.

3.4.2. *E.coli K12 EB 53*

Die *hemA*-Zellen wiesen schon bei OD_{578}= 0,13 voll ausgeprägte Transportsysteme auf. Die Aufnahmeraten nahmen mit steigender OD ab, und nur der FC-Transport zeigte bis OD_{578}= 0,74 wieder eine Zunahme (s.Abb.7b).
Die langsamere Zunahme der Transportraten mit steigender Zellzahl beim *WT* kann dadurch zustande gekommen sein, daß die Zellen erst mal eine sogenannte "lag"-Periode durchlaufen mußten, während der sie vom aeroben auf anaeroben Stoffwechsel umschalteten. Entweder läuft im anaeroben Zustand keine Atmung mehr ab, dann muß verstärkt ATP hydrolysiert werden, um den energetisierten Membranzustand aufrecht zu erhalten, oder die Zelle muß erst neue Atmungskettenkomponenten wie z.B. Menachinon synthetisieren, damit eine Alternativatmung über die Fumarat-Reduktase erfolgen kann (6, 29).
Bei der *hemA*-Mutante *EB 53* wurde in einer anaeroben Vorkultur angezüchtet, d.h. die Nachfolgekultur hatte schon von Anfang an optimale Energetisierungsmöglichkeiten für die jeweiligen Transportsysteme.
Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Experimenten war, daß bei gleichen Kolbendimensionen im Falle von *EB 53* 70 ml Zellkultur verglichen mit 50 ml beim *WT* verwendet wur-

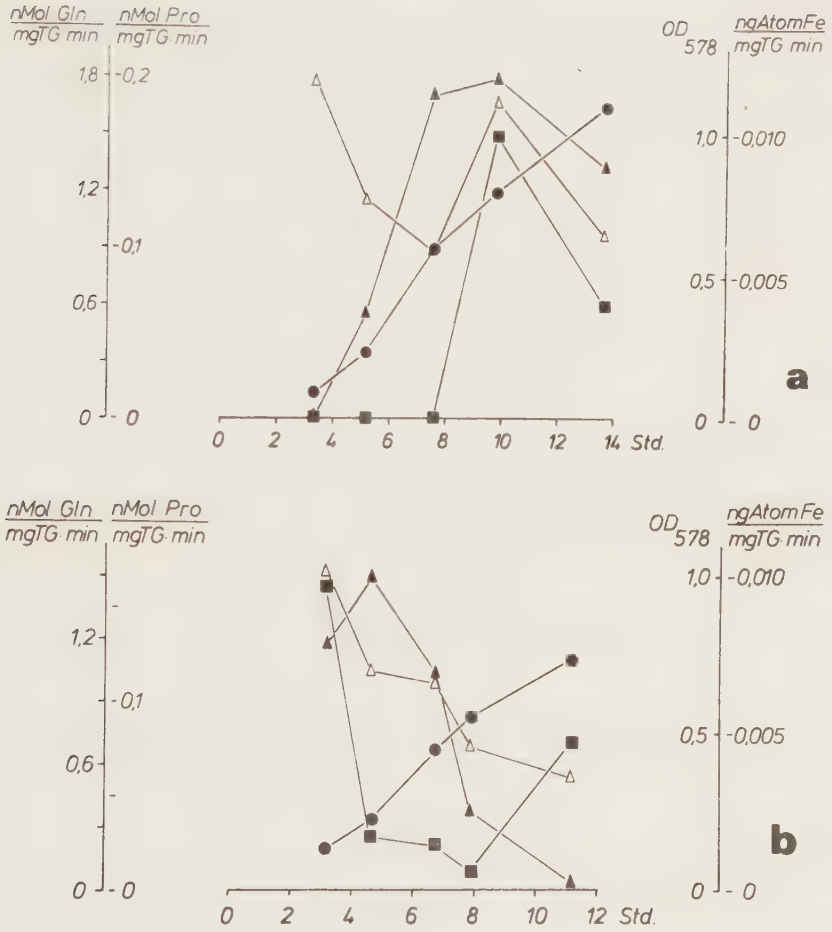

Abb.7: Aerober Transport nach anaerobem Wachstum in *AB 2847 WT* (a) und *hemA*-Mutante *EB 53* (b).

● ——— ● Zellwachstum ▲ ——— ▲ Pro-Transport

△ ——— △ Gln-Transport ■ ——— ■ FC-Aufnahme

Die Zellen wurden anaerob gezüchtet wie unter 2.5.3. beschrieben, bei der angegebenen Zeit geerntet und für Transportmessungen präpariert. Beim *WT* wurde eine aerobe Vorkultur benutzt, während diese bei der *hemA*-Mutante anaerob war (Wachstum in Gegenwart von 12,5 µM ALA).

den. Dies ist gleichbedeutend mit einer geringeren Trennfläche zwischen flüssiger Phase und Gasphase bei *EB 53*. Es wäre möglich, daß bei anaerober Anzucht der Zellen von *EB 53* das Kulturmedium mehr Zeit brauchte, um vollkommen anaerob zu werden. Es wäre somit denkbar, daß bei der ersten Messung bei *EB 53* die Eisen-Reduktase noch in genügender Menge vorlag, sodaß aerober FC-Transport beobachtet werden konnte. Der spätere Verlauf ähnelt dann dem beim *WT*.

3.4.3. Rekonstitution der Transportaktivitäten nach anaerobem Wachstum von *AB 2847 WT* durch aerobes Weiterwachstum

Wie man aus Abb.8 ersehen kann, waren der Gln-Transport und die FC-Aufnahme nach ca. 3 Generationszeiten aeroben Weiterwachstums wieder auf normalem Niveau, während der Pro-Transport keine Kontinuität der Änderungen aufwies.
Dieser Versuch diente nur als Vorversuch zur Optimierung des Wachstums von Mutante *EB 53*, deshalb wurde auch nicht weiter ermittelt, inwieweit die Prolin-Daten reproduzierbar sind.

3.5. Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Energetisierbarkeit der Transporte von Pro, Gln und FC in *AB 2847 WT*

Die Zellen wurden aerob angezüchtet ohne Glucose in Gegenwart von der jeweilig betrachteten C-Quelle. Dies sollte unter anderem Aufschluß darüber geben, ob der Ferrichromtransport der Katabolit-Repression von Glucose unterliegt.

3.5.1. Li-Lactat

Obwohl die Zellen auf 0,34% Lactat wuchsen, hemmte bei der Aufnahme 0,4% Lactat sämtliche untersuchten Transportsysteme (s.Tab.3). In 4fach geringerer Konzentration eingesetzt war eine Stimulierung der Transportaktivitäten zu beobachten.
Die Aufnahmeraten bei Pro- und Gln-Transport lagen wesentlich höher als normal (vgl. Tab.1), was damit zusammenhängen könnte,

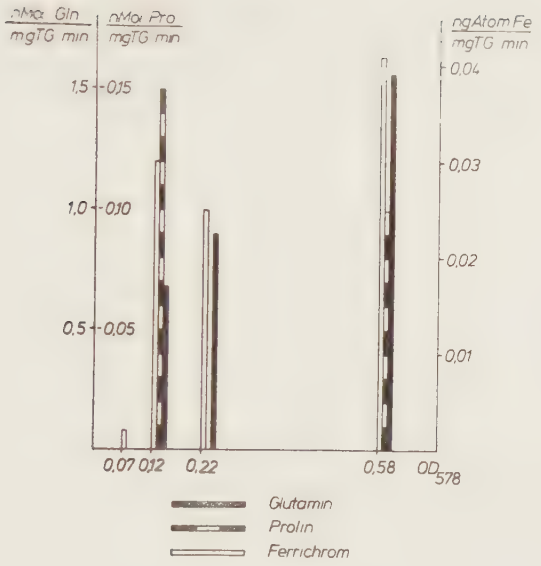

Abb.8: Rekonstitution der Transportaktivitäten in *AB 2847 WT* nach anaerobem Wachstum.
Die Zellen wurden ohne Vorkultur anaerob gezüchtet bis OD_{578}= 0,07. Die Kultur wurde dann aerob weiter geschüttelt bei 37°C. Bei den angegebenen optischen Dichten wurden die Transportaktivitäten gemessen.

Tab.3: Transportenergetisierung durch Lactat

Die Zellen wurden auf 0,34% Li-Lactat ohne Casaminosäuren aerob angezogen. Die Aufnahmeraten sind angegeben in $\frac{\text{ngAtom}}{\text{min}\cdot\text{mgTG}}$ bzw. $\frac{\text{nMol}}{\text{min}\cdot\text{mgTG}}$.

C-Quelle	Ferrichrom	Prolin	Glutamin
0,1% Glucose	0,016	0,66	3,99
0,4% Glucose	0,035	0,86	3,27
0,1% Lactat	0,024	0,45	1,76
0,4% Lactat	0	0	0

daß diese Zellen ohne Casaminosäuren gewachsen waren und somit einen höheren Bedarf an diesen Aminosäuren hatten. Kayama (42) hatte außerdem gezeigt, daß Lithium-Ionen in ganzen Zellen von *E.coli K12* den Prolin-Transport um den Faktor 6 stimulieren können.

3.5.2. Succinat

Die Transporte von Prolin und Glutamin wurden mit 0,4% Succinat genauso gut energetisiert wie mit Glucose (s.Tab.4). Die Ferrichromaufnahme war mit Succinat genauso effektiv wie mit Glucose bei Zellen, die auf Glucose gewachsen waren (vgl.Tab.1). Bei den auf Succinat gewachsenen Zellen konnte der FC-Transport allerdings nur auf etwa 1/3 der normalen Aktivität gebracht werden, wenn Glucose beim Transport verwendet wurde.
Rainnie und Bragg (59) zeigten, daß Wachstum von *E.coli* auf Succinat in Gegenwart von Fe(III)-Citrat zu verstärkter Synthese von Cytochromen führt, da diese C-Quelle die Zelle nur über die Atmungskette energetisieren kann. Die Induktion von Atmungskettenkomponenten bedingt gleichzeitig einen größeren Bedarf an Eisen, welches zur Synthese der prosthetischen Gruppen der Cytochrome und zur Neusynthese von Eisen-Schwefel-Proteinen benötigt wird.
Werden nun diese Zellen beim Transport mit Glucose energetisiert, wird die volle Atmungskapazität nicht benötigt, da auch Energieäquivalente auf der Ebene der Substratphosphorylierung bereitgestellt werden. Die Zelle hat nun einen geringeren Bedarf an Eisen, was sich letztlich in der Aufnahmerate für ^{55}Fe über das Ferrichromsystem niederschlägt. Daß die Energetisierung mit Glucose und Succinat gleich gut abläuft, zeigt sich bei den Prolin- und Glutamindaten.

3.5.3. Glycerin

Die Prolin- und Ferrichromaufnahme zeigten keinen Unterschied in der Energetisierbarkeit zwischen Glucose und Glycerin (vgl. Tab.5). Beim Glutamintransport jedoch ließ sich noch eine

Tab.4: Transportenergetisierung durch Succinat

Die Zellen wurden auf 0,34% Succinat aerob angezogen. Die Aufnahmeraten sind angegeben in $\frac{ngAtom}{min \cdot mgTG}$ bzw. $\frac{nMol}{min \cdot mgTG}$.

C-Quelle	Ferrichrom	Prolin	Glutamin
0,4% Glucose	0,013	0,28	2,87
0,4% Succinat	0,038	0,38	2,87

Steigerung um den Faktor 2 mit Glycerin beobachten. Bezüglich der untersuchten Transportsysteme spielt also die Katabolit-Repression von Glucose keine Rolle.
Glycerin wird über Glycerin-3-Phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat metabolisiert unter Bildung von $FADH_2$, welches direkt vom Ubichinon Q_8 der aeroben Atmungskette von *E.coli* oxidiert wird (29). Diese Wechselwirkung mit der Atmungskette bevor Dihydroxyacetonphosphat in die Glykolyse einspeist ermöglicht eine zusätzliche Energetisierung der Membran verglichen mit dem Glucose-Stoffwechsel. Es wird dann wiederum mehr ATP synthetisiert über die oxidative Phosphorylierung. ATP wirkt als Inhibitor der Isocitrat-Dehydrogenase (47) des Citronensäurezykluses, welcher bei erhöhtem ATP-Spiegel gestoppt wird.
Das Acetyl-CoA, welches weiterhin über die Glykolyse erzeugt wird, führt dann zu erhöhten Mengen an Acetylphosphat und somit zu verstärktem Glutamintransport.

3.5.4. Acetat

Obwohl die Zellen jedesmal in 0,34% Acetat-haltigem Kulturmedium angezogen wurden, erhielt man stark unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von der jeweiligen Acetat-Konzentration, die beim Transport eingesetzt wurde.
0,4% Acetat hemmte alle 3 untersuchten Transportsysteme stark. Bei 0,1% Acetat waren die Transportraten identisch mit der

Tab.5: Transportenergetisierung durch Glycerin

Die Zellen wurden auf 0,34% Glycerin aerob gezüchtet. Die Aufnahmeraten sind angegeben in $\frac{ngAtom}{min \cdot mgTG}$ bzw. $\frac{nMol}{mgTG \cdot min}$.

C-Quelle	Ferrichrom	Prolin	Glutamin
0,4% Glucose	0,045	0,45	2,30
0,4% Glycerin	0,040	0,51	5,04

Kontrolle und selbst mit 0,05% Acetat waren die Transportsysteme nur minimal stimulierbar (vgl.Tab.6). Erst mit 0,01% Acetat konnte beispielsweise der Pro-Transport voll energetisiert werden, während der Gln-Transport 52% und die FC-Aufnahme 62% der Aktivität erreichten, die mit Glucose als Energiequelle erhalten wurde, wenn die Zellen auf Glucose-Medium gewachsen waren (vgl.Tab.1).
Wenn die Zellen auf Acetat wachsen, wird dieses via Acetylphosphat und Acetyl-CoA über den Glyoxylat-Zyklus metabolisiert. Dabei muß Acetat aktiv transportiert werden und benötigt ATP zur Synthese von Acetylphosphat (27). Da dieses, bedingt durch die schnelle Umsetzung zu Acetyl-CoA, nur in geringen Konzentrationen vorliegen kann, können die entsprechenden Transportsysteme auch weniger gut energetisiert werden. Dies erklärt die niedrigeren Aufnahmeraten beim Ferrichrom- und Glutamintransport.
Die erhöhten Pro-Transport-Werte könnte man mit einem höheren Bedarf der Zelle für diese Aminosäure erklären, um über Glutamat α-Ketoglutarat zu synthetisieren, welches im Glyoxylat-Zyklus nicht vorkommt aber für den Krebs-Zyklus benötigt wird. Die erhöhte Aktivität der FC-Aufnahme bei Glucose-energetisiertem Transport (167% des Normalwertes, vgl. Tab.1) spricht für einen stärkeren Eisenbedarf der Zelle. Das Eisen könnte zur Neusynthese von Enzymen wie der Aconitase gebraucht werden, damit der Krebs-Zyklus verstärkt ablaufen kann und die Mengen an Acetyl-CoA, die nun über die Glykolyse produziert werden,

auch verkraftet. Darüberhinaus ist es auch denkbar, daß zusätzlich Eisen enthaltende Bestandteile der Atmungskette gebildet werden, da mit Glucose als C-Quelle größere Mengen an Redoxäquivalenten metabolisiert werden müssen.

Tab.6: Transportenergetisierung durch Acetat

Die Zellen wurden auf 0,34% Acetat aerob gezüchtet. Die Aufnahmeraten sind angegeben in $\frac{\text{ngAtom}}{\text{mgTG}\cdot\text{min}}$ bzw. $\frac{\text{nMol}}{\text{mgTG}\cdot\text{min}}$.

C-Quelle	Ferrichrom	Prolin	Glutamin
0,4% Glucose	0,065	0,30	2,21
0,05% Acetat	0,011	0,05	0,09
0,01% Acetat	0,024	0,27	1,09

3.6. Auswirkungen verschiedener pH-Bereiche auf die Ferrichromaufnahme

3.6.1. Hemmbarkeit der Transportaktivitäten durch Valinomycin bei verschiedenen pH-Werten

Nach Kaback (37) gibt es zwei Klassen von Transportsystemen: die einen werden bei pH 5,5 vorwiegend über die "proton motive force" (Klasse I) und die anderen hauptsächlich über ΔpH (Klasse II) energetisiert. Typische Vertreter dieser Kategorien sind Prolin (Klasse I) und Glucose-6-Phosphat (Klasse II). Wird Valinomycin in geeigneter Konzentration zu Tris/EDTA-behandelten Zellen in Gegenwart von K^+ gegeben, beobachtet man bei pH 5,5 eine Zunahme von ΔpH während $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ abnimmt, d.h. Substrate von Transportsystemen der Klasse I werden sehr viel weniger gut transportiert, wohingegen die Aufnahmesysteme der Klasse II eine Stimulierung der Aktivität erfahren. Bei einem äußeren pH von 7,5 konnte Kaback zeigen, daß der ΔpH über die Cytoplasma-Membran gleich O wird, während $\Delta\psi$

über den Bereich von pH 5,0 bis pH 8,0 relativ konstant bleibt. In Gegenwart von Valinomycin/K^+ bei pH 7,5 zeigen also beide Klassen von Transportsystemen keine bzw. sehr stark verringerte Aktivitäten. Daß dies nicht nur für Vesikel gilt sondern auch für ganze Zellen wurde von Tokuda und Konisky (68) gezeigt. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die Ferrichromaufnahme einer dieser beiden Klassen von Transportsystemen zuzuordnen ist.

Wenn man sich die Aufnahmeraten in Tab.7 ansieht, entdeckt man, daß bis auf den Prolintransport bei pH 5,5 der Pro- und der G6P-Transport den Modellvorstellungen entsprechen. Man erkennt gleichzeitig, daß die Behandlung der Zellen mit Tris/EDTA und Kälteschock den Pro-Transport empfindlich herabsetzte und es deshalb fraglich ist, inwieweit man die erhaltenen Prolin-Daten zur Beurteilung der geschaffenen Verhältnisse heranziehen kann.

Unter den in Tab.7 erwähnten Bedingungen wurde die Ferrichromaufnahme bei pH 7,5 voll inhibiert und zeigte keine Veränderung bei pH 5,5, wenn Valinomycin zugegeben wurde. Dies würde eher auf eine Zugehörigkeit zu Transportsystemen der Klasse II als zu denen der Klasse I hindeuten.

Tab.7: Einfluß von Valinomycin auf die Transportaktivitäten bei verschiedenen pH-Werten

Die Zellen wurden vorbehandelt wie unter 2.8. beschrieben. Die Kontrolle gibt die Transportraten an, die bei Zellen der gleichen Kultur erhalten wurden, welche nicht Tris/EDTA-behandelt und keinem Kälteschock ausgesetzt waren. Die Aufnahmeraten sind angegeben in $\frac{\text{ngAtom}}{\text{mgTG}\cdot\text{min}}$ bzw. $\frac{\text{nMol}}{\text{mgTG}\cdot\text{min}}$.

Transportansatz	Ferrichrom		Prolin		Glucose-6-Phosphat	
	pH 5,5	pH 7,5	pH 5,5	pH 7,5	pH 5,5	pH 7,5
+ Glucose	0,019	0,025	0,083	0,037	17,2	9,5
+ Glucose + Valinomycin (8µM)	0,019	0	0,104	0	26,8	0
Kontrolle	0,022	0,031	0,169	0,189	23,5	20,0

3.6.2. Versuche mit Colicin Ia

Um Nebeneffekte der Tris/EDTA-Behandlung auf die Zellen auszuschalten, wurden auch Experimente durchgeführt, wo normal behandelte Zellen beim Transport mit zunehmenden Konzentrationen an Colicin Ia-Rohextrakten versetzt wurden (hergestellt wie unter 2.9.1. beschrieben). Dieses Bacteriocin hat im Prinzip die gleiche Auswirkung auf die Zelle wie Valinomycin/K^+: es baut das Membranpotential $\Delta\psi$ über die Cytoplasma-Membran ab (68). Die Behandlung der Zellen mit dem Colicin führte zur Hemmung von Pro- und G6P-Transport bei pH 5,5 und pH 7,5. Da es sich um einen Rohextrakt von Colicin Ia handelte, hätte dieses erst weiter angereichert und gereinigt werden müssen, bevor man eindeutige Aussagen in Bezug auf die Ferrichromaufnahme hätte machen können.

3.6.3. pH-Abhängigkeit der Ferrichromaufnahme

In Anlehnung an Kaback (37) sollten Transportsysteme, die über $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ oder ΔpH energetisiert werden bei pH 5,5 ein Maximum bezüglich der Aktivität aufweisen. Solche Systeme, die ΔpH-abhängig sind, sollten bei pH 7,5 und darüber nur sehr wenig oder gar keine Substratakkumulierung haben.
Wie Abb.9 zeigt, bleibt die Ferrichromaufnahme über den gesamten Bereich von pH 5,5 bis pH 8,0 konstant. Erst bei pH 5,0 ist ein Absinken der Aufnahmerate zu beobachten.

3.7. Biologische Aktivität von enantio-Ferrichrom

Es sollte geklärt werden, inwieweit die Stereospezifität eine Rolle spielt beim Ferrichromtransport. Zu diesem Zweck wurde die enantiomere Form des Ferrichroms eingesetzt, welche uns freundlicherweise von H.-U. Naegeli zur Verfügung gestellt worden war (54).
Die Messung der Aufnahmeraten in je 2 Kulturen von Stamm *AB 2847 WT* und *AB 2847 uncA* ergab, daß das enantio-Ferrichrom eine Transportaktivität von 64% (±14%) verglichen mit der des

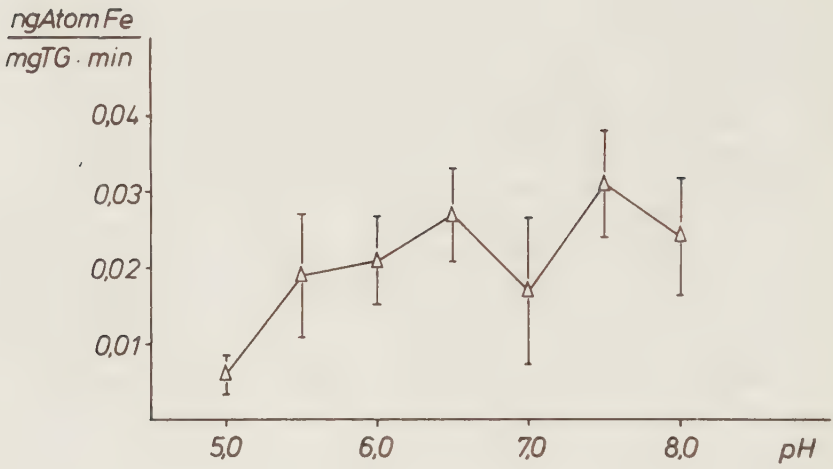

Abb.9: Ferrichromaufnahme in Abhängigkeit vom pH

Die Transportraten beim jeweiligen pH-Wert geben die Durchschnittswerte von 3 verschiedenen Kulturen wieder mit den zugehörigen Standardabweichungen.

natürlichen Ferrichroms besitzt. Dies steht im Einklang mit anderen Resultaten, wo das Enantiomer Wuchsstoffeigenschaften aufwies oder im Kreuztest die Wirkung von Albomycin kompetitiv aufhob aber etwas weniger aktiv war als das natürliche Ferrichrom (17).

3.8. Bedeutung der Cytochrome für die Ferrichromaufnahme

Flatmark und Romslo (24) haben 1975 gezeigt, daß in Rattenleber-Mitochondrien Fe(III) mit der Atmungskette ein Redox-Gleichgewicht auf dem Niveau von Cytochrom C eingeht, zu Fe(II) reduziert wird und erst in dieser Oxidationsstufe die innere Membran durchquert, um in der Matrix dann an noch nicht charakterisierte Liganden zu binden.

Aus diesem Grunde ergab sich die Frage, ob Cytochrome bei der Ferrichromaufnahme eine Rolle spielen, indem sie das Eisen im Chelat zu Fe(II) reduzieren oder ob sie nur in Bezug auf die Energetisierung von Bedeutung sind, wo sie für eine funktionsfähige Atmungskette benötigt werden.

3.8.1. Eigenschaften der *hemA*-Mutante *EB 53*

Wie schon unter 2.4.2. beschrieben wurde aus dem Stamm *AB 2847 WT* mittels Neomycin-Selektion die Mutante *EB 53* isoliert, welche eine Spontanmutation im *hemA*-Genbereich aufweist. Selektion für Neomycin-Resistenz wird im allgemeinen dazu verwendet, *E.coli*-Mutanten zu finden, die einen Defekt in der Atmungskette (*hem, ubi*) oder in der oxidativen Phosphorylierung (*unc*) aufweisen und somit nicht mehr ausreichend Energie für den aktiven Transport des Antibiotikums in die Zelle besitzen (41).
Die Mutante *EB 53* zeigte kein Wachstum auf M9/Succinat-Platten ohne ALA, wenn die Kolonien direkt von einer mit ALA supplementierten Vollmedium-Platte übertragen und ausgestrichen wurden.
Bei aerobem Wachstum ohne ALA (bis OD_{578}= 0,2) wurde eine Reversionshäufigkeit von < 10^{-3}% beobachtet. Um zu klären, ob dies auf tatsächlicher Reversion beruht oder ob die Mutante "leaky" ist, d.h. ob die *hemA*-Mutation nicht voll ausgeprägt ist, wurden die Zellen anaerob gezüchtet und anschließend die Cytochromspiegel gemessen wie unter 2.10. geschildert.
Die Abb.10 zeigt das Differenzspektrum von Mutante *EB 53*. Kurve I zeigt das Cytochromspektrum nach anaerobem Wachstum auf 12,7 µM ALA. Als Maß für die Menge an Cytochromen dient die Soret-Bande bei 425 nm. Kurve II gibt das Differenzspektrum nach anaerobem Wachstum in Abwesenheit von ALA wieder. Man sieht, daß die Mutante keine meßbaren Mengen an Cytochromen enthielt.
Abb.11 demonstriert die relativen Mengen an Cytochromen in aerob ohne ALA gewachsenen Zellen von *AB 2847 WT* (Kurve I) und *hemA*-Mutante *EB 53* (Kurve II), welche ca. 17% der Cytochrommenge des Wildtyps bedingt durch Reversion aufwies.

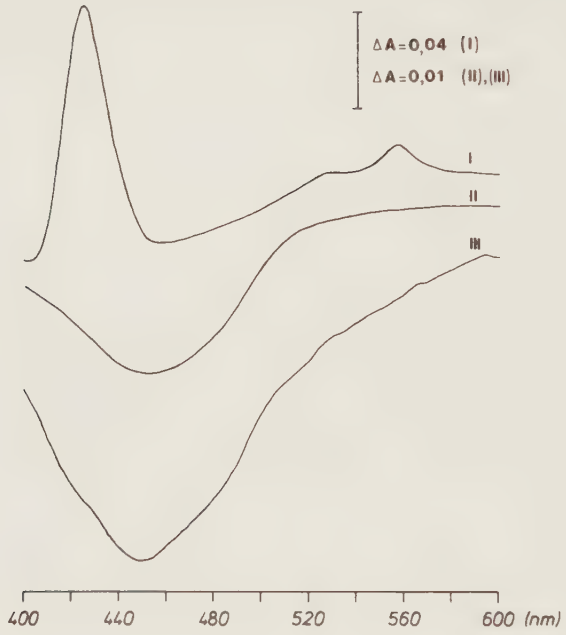

Abb.10: Cytochromspiegel in *hemA*-Mutante *EB 53*

Kurve I: Anaerobes Wachstum auf 12,7 µM ALA bis OD_{578}= 0,34
Kurve II: Anaerobes Wachstum ohne ALA bis OD_{578}= 0,25
Kurve III: Aerobes Wachstum ohne ALA bis OD_{578}= 0,53 nachdem die Zellen bis OD_{578}= 0,16 in Gegenwart von 1,3 µM ALA aerob vorgewachsen waren.

3.8.2. Korrelation zwischen Transportaktivitäten und Cytochromgehalt

Anaerob gewachsene Zellen von *EB 53* zeigten zwar keine Cytochrome mehr bei Wachstum ohne ALA, konnten aber für Messungen von aeroben Transportaktivitäten nicht verwendet werden, da

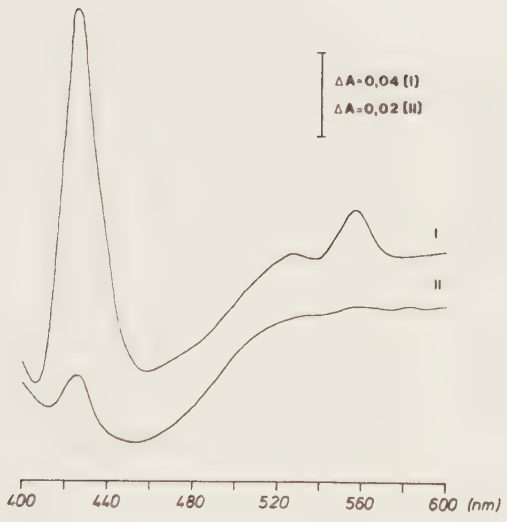

Abb.11: Cytochromspiegel in *AB 2847 WT* und *EB 53* nach aerobem Wachstum ohne ALA

Kurve I : Wachstum von *AB 2847 WT* bis OD_{578}= 0,22
Kurve II : Wachstum von *EB 53* bis OD_{578}= 0,13

diese in Abhängigkeit vom Wachstum stark variieren (vgl. Abb.7b). Deshalb wurde nach einem Weg gesucht, die Mutante aerob ohne Reversion zu züchten, sodaß sie keine Cytochrome mehr enthielt. Es erwies sich, daß dies am besten erreicht werden konnte, wenn die Zellen wie unter 2.5.2. beschrieben behandelt wurden. Kurve III aus Abb.10 spiegelt das Differenzspektrum der so präparierten Zellen wider.
Aus Abb.12 erkennt man, daß schon nach zwei Generationen des Weiterwachstums in ALA-freiem Medium keine Cytochrome mehr gefunden wurden. Der Gln-Transport zeigte keine großen Veränderungen und nahm allmählich ab auf 62% bei OD_{578}= 0,90. Die Ferrichromaufnahme variierte stärker, zeigte aber keine drastische Abnahme in Cytochromfreien Kulturen.

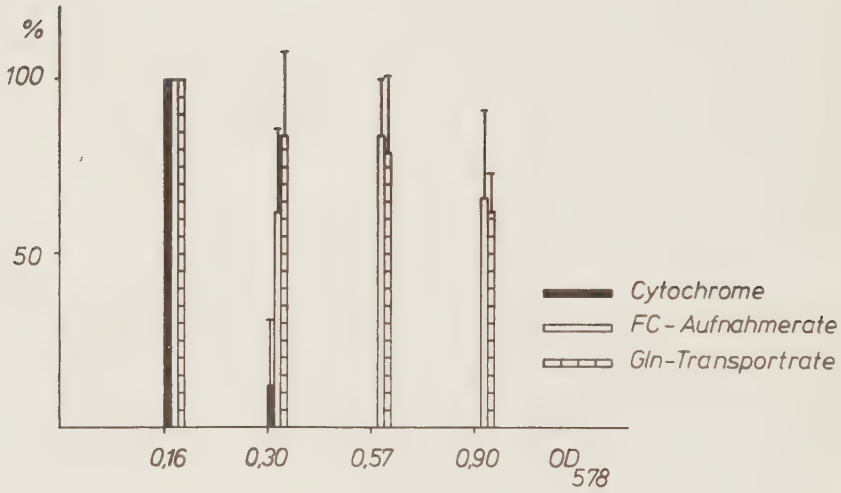

Abb.12: Zusammenhang zwischen Cytochromgehalt und Transportaktivitäten in *EB 53*

Die angegebenen Werte sind auf mgTG bezogen. 100% entspricht der Menge an Cytochromen pro mgTG bzw. den Aufnahmeraten in Zellen, die bei OD_{578}= 0,16 geerntet wurden. Die Zellen wurden präpariert wie unter 2.5.2. beschrieben.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Anwesenheit von Cytochromen nicht unbedingt erforderlich ist für den Transport von Ferrichrom und Glutamin in die Zelle. Es muß also keine direkte Wechselwirkung zwischen Cytochromen und Eisen des FC-Komplexes stattfinden, um dieses durch Reduktion zu (FeII) aus dem Chelat zu mobilisieren.

3.8.3. Arsenat-Inhibierung der restlichen Transportaktivitäten in *EB 53* nach Cytochromaushungern

Nimmt man an, daß die Abnahme der FC- und Gln-Aufnahmeraten während des Weiterwachstums der Zellen ohne ALA auf einer schlechteren Energetisierung mangels einer funktionsfähigen Atmungskette beruht, so sollte dieser Resttransport, welcher dann nur mittels energiereicher Phosphatverbindungen direkt oder über den energetisierten Membranzustand energetisiert werden kann, mit Arsenat hemmbar sein.
Daß dies auch tatsächlich der Fall ist zeigt Tab.8. Die FC-Aufnahme bei Zellen, die bei OD_{578}= 1,14 geerntet worden waren, konnte mit 10 µM Arsenat auf 1% des Wertes gehemmt werden, der bei nichtinhibierten Zellen gemessen wurde, die bei OD_{578}= 0,16 geerntet worden waren und noch Cytochrome enthielten. Der Gln-Transport konnte mit 20 µM Arsenat auf 8% reduziert werden. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß der FC-Transport stärker an die "pmf" gekoppelt ist als der Gln-Transport und unter diesen Bedingungen schneller auf eine Reduzierung des ATP-Spiegels in der Zelle reagiert.
Bei OD_{578}= 0,16, wo die Zellen noch Cytochrome besaßen, bewirkten dieselben Arsenat-Konzentrationen eine Stimulierung der Ferrichromaufnahme hatten aber keinen nennenswerten Effekt auf den Gln-Transport. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen beim Wildtyp *AB 2847*, wo jedesmal eine deutliche Inhibierung beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung wäre, daß in der *hemA*-Mutante *EB 53* 10 µM Arsenat den ATP-Spiegel in der Zelle senkt im Gegensatz zu *AB 2847 WT*. Da in diesem Experiment die Atmungskette von *EB 53* weniger Cytochrome enthält als die von *AB 2847 WT*, läuft die oxidative Phosphorylierung wesentlich schlechter ab. Unter diesen Bedingungen nimmt die Zelle über das Ferrichromsystem mehr Eisen auf, um es dann in bereits vorliegende Cytochromapoproteine (64) einzubauen und damit die schlechtere Atmungsaktivität zu kompensieren.

Tab.8: Arsenat-Hemmung der Transportaktivitäten von Mutante *EB 53* während des Cytochrom-Aushungerns

Die Zellen wurden vorbehandelt wie unter 2.5.2. beschrieben. Es sind die Aufnahmeraten für FC- und Gln-Transport in $\frac{\text{pgAtom Fe}}{\text{mgTG}\cdot\text{min}}$ bzw. $\frac{\text{nMol Gln}}{\text{mgTG}\cdot\text{min}}$ bei der jeweiligen optischen Dichte angegeben, bei der die Zellen geerntet wurden.

Arsenat-Konzentration (µM)	Ferrichrom		Glutamin	
	OD_{578}=0,16	OD_{578}=1,14	OD_{578}=0,16	OD_{578}=1,14
0	10,0	2,6	2,09	1,42
10	14,0	0,1	2,32	0,43
20	16,0	0,3	1,76	0,17

3.8.4. Zusammenhang zwischen Cytochromspiegel und Atmungsraten bei *EB 53*

Die Zellen wurden aerob cytochromfrei gezüchtet wie beschrieben unter 2.5.2. Bei einer optischen Dichte von 0,19 wurden die Zellen in ALA-freiem Medium resuspendiert, bei 37 °C weiter inkubiert und bei OD_{578}= 1,2 geerntet. Bei jeweils einer Hälfte der Zellen (A) wurden die Atmungsraten im Medium gemessen (s.2.11.), die andere Hälfte (B) wurde 3 mal gewaschen und in M9-Puffer resuspendiert, bevor auch hier die Oxidationsraten bestimmt wurden. Abb.13 ist ein typisches Beispiel für die Aufnahme von Atmungsraten in gewaschenen Zellen. Kurve I zeigt Atmung bei cytochromfreien Zellen, während Kurve II dasselbe bei Zellen demonstriert, die nicht Cytochromausgehungert waren. Die Pfeile geben den Zeitpunkt an, wo 10 µl 40% Glucose zu 3 ml der jeweiligen Zellsuspension gegeben worden waren, um die Atmung zu starten. Bei Zellen, wo Oxidationsraten direkt im Medium gemessen wurden, war keine Stimulierung der Atmungsrate durch Glucose mehr möglich. Die Cytochrome enthaltenden Zellen waren ohnehin schon stark atmungsaktiv, während die cytochromfreien Bakterien überhaupt keine Atmung mehr zeigten.

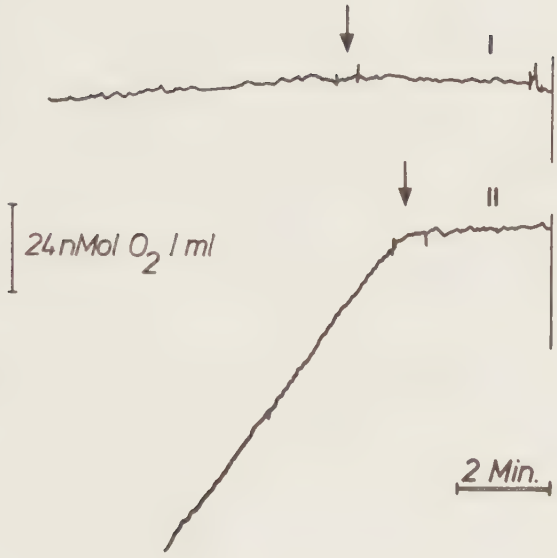

Abb.13: Atmungsraten bei Zellkulturen von *EB 53*

Die Zellen wurden wie unter 2.5.2. genannt behandelt. Die Kurven wurden von rechts nach links aufgezeichnet.

Kurve I : Die Zellen wurden auf 1,3 µM ALA bis OD_{578}= 0,19 gezüchtet. Nach 3maligem Waschen wurden sie dann in ALA-freiem Medium bis OD_{578}= 1,2 angezogen.

Kurve II: Gibt die Atmungsrate der Zellen der gleichen Kultur wieder, welche bei OD_{578}= 0,19 geerntet worden waren.

Der Pfeil gibt den Zeitpunkt an, wo Glucose zugegeben wurde, um die Atmung zu starten.

Tab.9 zeigt, daß im Falle der Cytochrome enthaltenden Kulturen bei gewaschenen Zellen die Atmungsrate auf etwa die Hälfte des Wertes bei nicht gewaschenen Zellen sank. Die physiologisch bedeutsameren Messungen sind die in nicht gewaschenen Zellen, und hier sieht man, daß es in den cytochromfreien Kulturen nur noch ca. 0,3% Restatmung gab, was vernachlässigbar gering ist.

Tab.9: Einfluß des Cytochromaushungerns auf die Atmungsraten von Mutante *EB 53*

Die Zellen wurden behandelt wie unter 2.5.2. beschrieben. Die Aufnahmeraten sind angegeben in $\frac{nMol\ O_2}{mgTG \cdot min}$ bei der jeweiligen optischen Dichte, wo die Zellen geerntet wurden.

Zellpräparation	OD_{578}=0,19	OD_{578}=1,20	%Restatmung
A	164,5	0,05	0,03
B	84,8	1,15	1,40

4. DISKUSSION

4.1. Ferrichromaufnahme im Energetisierungsschema

Wie aus den Inhibitionsexperimenten ersichtlich ist (vgl.3.1.), benötigt die Ferrichromaufnahme für den aktiven Transport von Eisen in die Zelle Phosphatbindungsenergie und die "proton motive force". Die Kopplung an den energetisierten Membranzustand ist dabei geringer als beim Prolintransport aber wesentlich stärker als bei der Glutaminaufnahme. Umgekehrt zeigt sich eine geringere Abhängigkeit von energiereichen Phosphatverbindungen als beim Glutamintransport.
ATP-Messungen zeigten unter denselben Bedingungen, wie sie für die Hemmexperimente verwendet wurden, keinen Zusammenhang zwischen dem intrazellulären ATP-Spiegel und der Aktivität der Transportsysteme von Ferrichrom bzw. Glutamin. Wenn man ATP als phosphorylierendes Agens beim Transport ausschließt, kommen als andere denkbare energiereiche Phosphatverbindungen außer Acetylphosphat noch 1,3-Diphosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat in Frage. Nimmt man an, daß die Ferrichromaufnahme neben dem energetisierten Membranzustand hauptsächlich über Acetylphosphat energetisiert wird, so sind zwei Mechanismen denkbar: Während der Eisenaufnahme muß eine Acetylierung oder Phosphorylierung des Aufnahmesystems bzw. des Eisenchelates selbst erfolgen.
Nähere Untersuchungen dazu sind noch im Gange, es gibt aber Anzeichen, die dafür sprechen, daß der Chelator während der Eisenaufnahme verändert wird (35).
Die Energetisierung der Eisenaufnahme über das Ferrichromsystem zeigt eine ähnliche Abhängigkeit wie dies schon früher von Pugsley und Reeves (58) für das Ferrienterochelin-System gezeigt worden war. Auf Grund neuerer Untersuchungen, die gezeigt haben, daß der Ferrienterochelin-Transport unabhängig ist von einem energetisierten Membranzustand (74), lassen sich jedoch nicht unmittelbar Parallelen ziehen zwischen diesen beiden Eisenaufnahmesystemen.
Da beide Systeme tonB-abhängig sind, sprechen diese neueren Ergebnisse bezüglich der Energetisierung der Ferrienterochelinaufnahme gegen eine Mitwirkung von tonB bei der Kopp-

lung des energetisierten Membranzustandes an Rezeptorabhängige Membrantransporte (30).
Wie schon zuvor erwähnt konnte keine Abhängigkeit des Glutamintransportes von ATP festgestellt werden. Andererseits wurde eine, wenn auch sehr schwache, Kopplung an die "proton motive force" beobachtet. Dies führt zu dem Energetisierungsschema der Abb.14. Als potentielle Energielieferanten sieht man den energetisierten Membranzustand, Acetylphosphat (AP), 1,3-Diphosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat. Ob die beiden letzteren Verbindungen auch eine Rolle spielen bei der Transportenergetisierung ist noch nicht erforscht worden, sie dürfen aber bei zukünftigen Untersuchungen nicht außer Acht gelassen werden.

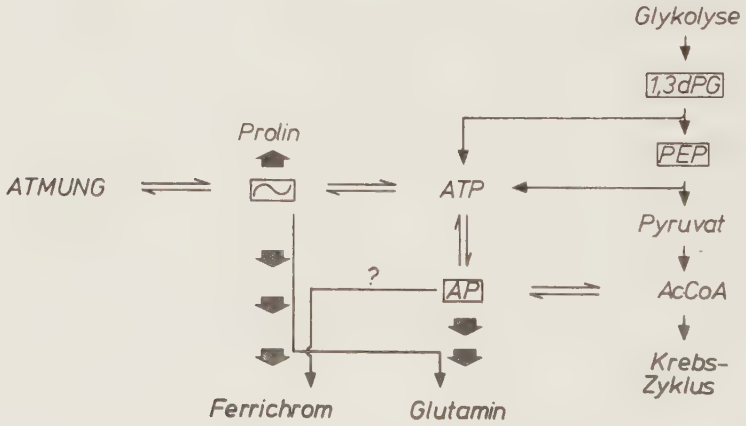

Abb.14: Ferrichromaufnahme im Energetisierungsschema

1,3dPG: 1,3-Diphosphoglycerat
PEP : Phosphoenolpyruvat
AP : Acetylphosphat
ATP : Adenosin-5'-Triphosphat
〜 : Energetisierter Membranzustand ("proton motive force")

4.2. Energetisierbarkeit der Ferrichromaufnahme durch verschiedene C-Quellen

Wie schon unter 3.5. beschrieben hemmten 0,4% Lactat und 0,4% Acetat beim Transport alle 3 untersuchten Aufnahmesysteme, d.h. selbst die geringe Transportaktivität, die normalerweise bedingt durch endogene Energiereserven beobachtet wurde, kam zum Erliegen. Es scheint wahrscheinlich,daß diese C-Quellen unter Bedingungen, bei denen die Zellen nicht wachsen, in den genannten Konzentrationen den Energiestoffwechsel hemmen, indem sie den Aufbau eines energetisierten Membranzustandes verhindern.
Von Lactat ist bekannt, daß es seinen eigenen Transport autoenergetisiert (40) und dafür die "proton motive force" benötigt. Auch von Acetat weiß man, daß es aktiv transportiert werden muß (27). Es ist durchaus denkbar, daß beide C-Quellen in den genannten hohen Konzentrationen die Energiereserven der Zelle für den eigenen Transport aufbrauchen und darüberhinaus als negativer Effektor auf ein Enzym des jeweiligen Stoffwechsels wirken (z.B. Lactat-Dehydrogenase bzw. Acetat-Kinase).
Die Ergebnisse der Succinat-Energetisierung lassen die Möglichkeit einer Regulation der Ferrichromaufnahme erkennen (z.B. über die Menge an Fe-enthaltenden Atmungskettenbestandteilen).

4.3. Ferrichromtransport bei verschiedenen pH-Bedingungen

Die Daten der Tab.7 lassen eine eindeutige Zuordnung der FC-Aufnahme zu einer Klasse der von Kaback postulierten Transportsystemklassen nicht zu. Es sieht jedoch so aus, als beruhe die Eisenaufnahme über das Ferrichromsystem bei pH 5,5 eher auf ΔpH als treibender Kraft als auf $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ bzw. $\Delta\psi$. Dies bedeutet, daß eine Art Protonen-Symportmechanismus, wie das auch für andere Transportsysteme postuliert wird (34), nicht auszuschließen ist. Es bleibt dabei ganz offen, ob dabei das Transportsystem protoniert wird oder der Chelator bzw. ein derivatisierter Chelator selbst.
Bei der FC-Aufnahme wird über den pH-Bereich von 5,0 bis 8,0

kein Maximum der Aufnahmeaktivität beobachtet (Abb.9), wie dies Kaback für ΔpH-abhängige Systeme fordert (37). Dies findet jedoch seine Erklärung darin, daß wir es nicht mit Vesikeln sondern mit ganzen Zellen zu tun haben. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der FC-Aufnahme könnte beispielsweise in der Bereitstellung von Phosphatbindungsenergie bestehen.

4.4. Stereospezifität des Ferrichromrezeptors

Norrestam et al. (55) zeigten, daß Fe(III)-Ionen in Chelatoren der Ferrichrom-Familie 3 Hydroxamatgruppen in einer oktaedrischen Δ-cis-Koordination als Liganden besitzen. Leong und Neilands (48) zeigten mittels eines kinetisch inerten Chrom-Analogons des Ferrichroms in Δ-cis-Konfiguration, daß dieses Koordinationsisomere eine Rolle spielt bei der Aufnahme von Eisen über das Ferrichromsystem in *E.coli*. Gleichzeitig postulierten die Autoren, daß die Aufnahme des Ferrichroms in die Zelle unabhängig ist von einer schnellen Isomerisierung bzw. Dissoziierung des Komplexes.
Für die leicht reduzierte Transportaktivität bei der enantiomeren Form des Ferrichroms (64%) kann es mehrere Gründe geben. Entweder weist jeder Schritt der Ferrichromaufnahme eine gewisse Stereospezifität bezüglich des Chelates auf, d.h. das Enantiomer wird zwar auch aufgenommen, aber bei jedem Schritt eben etwas schlechter als die natürliche Verbindung, oder es sind nur wenige Schritte (oder nur ein einziger), bei denen die enantiomere Form aufgrund ihrer räumlichen Struktur schlechter aufgenommen wird.
Die Ferrichromaufnahme in *E.coli* scheint jedoch generell weniger spezifisch zu sein als in Pilzen wie *Neurospora crassa* und *Aspergillus*, wo eine deutliche Bevorzugung des natürlichen Ferrichroms gegenüber der enantio-Form gefunden wurde (71).

4.5. Bedeutung der Atmungskette für den Ferrichromtransport

Die Untersuchungen von 3.8. sollten dazu dienen, zu ermitteln, ob Teile der Atmungskette (in diesem Falle die Cytochrome) zur Reduktion von Fe(III) während dessen Aufnahme über das Ferrichromsystem benötigt werden. Die Reduktion von Fe(III) durch Komponenten der Atmungskette in verschiedenen Organismen war von mehreren Autoren postuliert worden (15, 24). Messungen der Cytochromspiegel und der Atmungsraten in *EB 53*-Zellen, die unter den in 2.5.2. genannten Bedingungen gezüchtet worden waren, zeigten, daß keine Cytochrome mehr vorhanden waren. Transportmessungen in diesen Zellen führten zu dem Schluß, daß die Cytochrome nicht notwendig sind für die direkte Reduktion des Eisens im Ferrichrom-Komplex sondern nur insofern, als sie wichtig sind für eine funktionsfähige Atmungskette zum Aufbau eines energetisierten Membranzustandes bei entsprechenden Bedingungen (z.B. in der *uncA*-Mutante).
Erstaunlich war die Tatsache, daß nach dem Überimpfen ALA-supplementierter Zellen in ALA-freies Medium schon nach 2 Generationen des Weiterwachstums keine Cytochrome mehr entdeckt werden konnten. Dies bedeutet, daß nicht nur eine Verdünnung sondern ein Abbau der Cytochrome erfolgte, was darauf beruhen könnte, daß sie eventuell einer raschen Umwandlung unterliegen, indem ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Neusynthese existiert. In ALA-freiem Medium könnte dann kein neues Häm mehr gebildet werden.
Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die angewandten Wachstumsbedingungen zu reduzierten cAMP-Spiegeln führen. Broman et al. (9) wiesen einen regulatorischen Effekt von cAMP auf die Cytochromsynthese nach. Andere Autoren präsentierten Daten, wonach cAMP absolut notwendig ist für ein funktionsfähiges Transhydrogenase-System und zur Synthese der Flavin-Adenin-Dinucleotide (18).
Ambudkar et al. schließlich fanden, daß Glucose die Biogenese von Enzymen der Atmungskette einschließlich der ATPase reprimiert (1). Glucose führt über die Inhibierung der Adenylatcyclase auch zu einem verringerten cAMP-Spiegel in der Zelle (26).

4.6. Modellhypothese für die Ferrichromaufnahme in *E.coli*

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Energetisierung des Ferrichromtransportes führen zu folgender Modellvorstellung der Eisenaufnahme über dieses System:
Das Desferri-ferrichrom cheliert Fe(III)-Ionen im Medium und gelangt an die äußere Membran der Bakterienzelle, wo es an seinen Rezeptor, das tonA-Genprodukt, bindet.
Ferrichrom benötigt für den Weitertransport das tonB-Genprodukt, welches nach Hantke und Braun (31) bei Translokationsprozessen durch die äußere Membran eine Rolle spielt. Es ist dabei ungeklärt, ob tonB als Kopplung von tonA an den energetisierten Membranzustand der Cytoplasmamembran fungiert und dabei tonA aktiviert, sodaß das Ferrichrom vom Rezeptor mittels einer Konformationsänderung in den periplasmatischen Raum freigegeben wird, oder ob tonB als strukturelles Protein am Weitertransport des Chelates beteiligt ist.
Beim jetzigen Stand der Untersuchungen ist nicht auszuschliessen, daß *E.coli*-Zellen ein periplasmatisches Bindeprotein für den Ferrichromtransport besitzen. Bei Zellen, die unter Eisenmangel-Bedingungen gezüchtet wurden, konnte eine leichte Zunahme der Bindung von ^{55}Fe-Ferrichrom an induzierte periplasmatische Proteine nach osmotischem Schock nachgewiesen werden (69). Das Ferrichrommolekül würde also mittels tonB von tonA auf das Bindeprotein übertragen.
Der nachfolgende Schritt wäre die Translokation durch die Cytoplasmamembran über einen Enzymkomplex, der Reductase- und evtl. Transacetylase-Aktivität besitzt. Das Eisen würde dann mittels NADH oder NADPH zu Fe(II) reduziert (32) und entweder direkt zur Synthese von Atmungskettenbestandteilen verwendet, oder es gelänge ins Cytoplasma, wo es in Eisenspeicher-Proteinen, wie sie für *B. megaterium* beschrieben worden sind (2), bis zur weiteren Verwendung gespeichert würde.
Abgesehen von den Cytochromen wäre auch eine direkte Reduktion des Eisens durch Teile der Atmungskette über die Reduktase denkbar.
Die Freisetzung des Eisens aus dem Chelat könnte unter gleichzeitiger oder nachfolgender Acetylierung der Hydroxamatreste

des Ferrichroms erfolgen, was die beobachtete Derivatisierung des Komplexbildners und die Abhängigkeit der Ferrichromaufnahme von Phosphatbindungsenergie analog dem Energetisierungsschema erklären würde.
Andererseits wäre es auch denkbar, daß das Eisen aus dem Komplex mobilisiert wird und der Chelator erst anschließend zum Ausschleusen chemisch modifiziert wird.
Energiereiche Phosphatverbindungen wie Acetylphosphat, Phosphoenolpyruvat und 1,3-Diphosphoglycerat könnten beim Transport des Eisens durch die Cytoplasmamembran eine Rolle spielen, wenn man annimmt,daß das zugehörige Transportsystem phosphoryliert werden muß analog dem Zuckertransport über das Phosphotransferase-System.
Frühere Untersuchungen zeigten, daß für die FC-Aufnahme das *sid*-Genprodukt erforderlich ist, welches in der Nähe von tonA kartiert (8, 32). Wo dieses Protein auf molekularer Ebene eine Rolle spielt, ist jedoch noch ungeklärt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Verwendung verschiedener Inhibitoren des zellulären Energiestoffwechsels und einer *uncA*-Mutante des Wildtyps konnte gezeigt werden, daß die Ferrichromaufnahme in *E.coli K12* schwächer an den energetisierten Membranzustand gekoppelt ist als der Prolin-Transport aber sehr viel stärker als der Glutamintransport.
Zur Energetisierung der Ferrichromaufnahme ist zusätzlich Phosphatbindungsenergie notwendig, diese Abhängigkeit ist allerdings geringer ausgeprägt als beim Glutamintransport.
Es konnte gezeigt werden, daß der zelluläre ATP-Spiegel nicht limitierend ist für den aktiven Transport von Ferrichrom oder Glutamin.
Die Verwendung verschiedener C-Quellen beim Transport zeigte, daß die Katabolit-Repression von Glucose bezüglich der untersuchten Transportsysteme keine Rolle spielt. Im Falle von Lactat und Acetat zeigte sich, daß Konzentrationen, wie sie beim Zellwachstum eingesetzt wurden, den Transport inhibierten, und dieser erst durch geringere Konzentrationen energetisiert werden konnte.
Messungen der Transportaktivität der Ferrichromaufnahme bei verschiedenen pH-Werten zeigten keine Änderung zwischen pH 5,5 und pH 8,0.
Durch die Wahl geeigneter Wachstumsbedingungen einer *hemA*-Mutante konnte gezeigt werden, daß die Ferrichromaufnahme in cytochromfreien Zellen nicht wesentlich beeinträchtigt ist. Wurden Zellen der *hemA*-Mutante, welche in mit δ-Aminolävulinsäure supplementiertem Wachstumsmedium gezüchtet worden waren und Cytochrome besaßen, in Medium ohne diese Substanz resuspendiert und weiter gezüchtet, beobachtete man einen Abbau der Cytochrome. Schon nach zwei Generationen besaßen die Zellen keine meßbaren Mengen dieser Häm-Verbindungen mehr.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ambudkar,S.V., Chandrasekaran,K., Somasundaram,T., Jayaraman,J. (1978), Proc.Indian Acad.Sci. 87(B):109-118

2. Arceneaux,J.E.L., Byers,B.R. (1976), J.Bacteriol. 127:1324-1330

3. Bachofer GmbH & CoKG (1978), Sauerstoffmeßgerät, Bedienungsanleitung

4. Berger,E.A. (1973), Proc.Nat.Acad.Sci.USA 70:1514-1518

5. Berger,E.A., Heppel,L.A. (1974), J.Biol.Chem. 249:7747-7755

6. Boonstra,J., Downie,J.A., Konings,W.N. (1978), J.Bacteriol. 136:844-853

7. Braun,V. (1977), Naturwissenschaften 64:126-132

8. Braun,V., Hancock,R.E.W., Hantke,K., Hartmann,A. (1976), J.Supramol.Structure 5:37(11)-58(32)

9. Broman,R.L., Dobrogosz,W.J., White,D.C. (1974), Arch.Biochem.Biophys. 162:595-601

10. Brown,K.A., Ratledge,C. (1975), FEBS Lett. 53:262-266

11. Burstein,C., Tiankova,L., Kepes,A. (1979), Eur.J.Biochem. 94:387-392

12. Chance,B. (1957), Meth.Enzymol. IV:273-329

13. Chappell,J.B. (1964), Biochem.J. 90:225-237

14. Curtis,S.J. (1974), J.Bacteriol. 120:295-303

15. Dailey,H.A.Jr., Lascelles,J. (1977), J.Bacteriol. 129:815-820

16. Devor,K.A., Schairer,H.U., Renz,D., Overath,P. (1974), Eur.J.Biochem. 45:451-456

17. Diddens,H. (1979), persönliche Mitteilung

18. Dills,S.S., Dobrogosz, W.J. (1977), J.Bacteriol. 131:854-865

19. DuPont 760, Luminescence Biometer, Instruction Manual, E.I.DuPont de Nemours & Co.(Inc.), Instrument Products Division, Wilmington, Delaware 19898, USA

20. Essenberg,R.C., Kornberg,H.L. (1975), J.Biol.Chem. 250:939-945

21. Estabrook,R.W. (1967), Meth.Enzymol. X:41-47

22. Estabrook,R.W., Werringloer,J. (1978), Meth.Enzymol. LII:212-220

23. Ferenci,T., Boos,W., Schwartz,M., Szmelcman,S. (1977), Eur.J.Biochem. 75:187-193

24. Flatmark,T., Romslo,I. (1975), J.Biol.Chem. 250:6433-6438

25. Fork,D.C. (1972), Meth.Enzymol. XXIV:113-122

26. Gonzalez,J.E., Peterkofsky,A. (1977), J.Supramol.Structure 6:495-502

27. Gottschalk,G. (1979), "Bacterial Metabolism", Springer Verlag New York

28. Gutowski,S.J., Rosenberg,H. (1976), Biochem.J. 154:731-734

29. Haddock,B.A., Jones,C.W. (1977), Bacteriol.Rev. 41:47-99

30. Hancock,R.E.W., Hantke,K., Braun,V. (1977), Arch.Microbiol. 114:231-239

31. Hantke,K., Braun,V. (1978), J.Bacteriol.135:190-197

32. Hantke,K. (1979), persönliche Mitteilung

33. Harold,F.M. (1972), Biol.Rev. 36:172-230

34. Harold,F.M. (1978), "The Bacteria", Bd.VI, Ornston,L.N., Sokatch,J.R. (Hrsg.), Academic Press, New York, S.463-521

35. Hartmann,A. (1979), persönliche Mitteilung

36. Hong,J., Hunt,A.G., Masters,P.S., Lieberman,M.A. (1979), Proc.Nat.Acad.Sci.USA 76:1213-1217

37. Kaback,H.R. (1976), J.Cell.Physiol. 89:575-594

38. Kadner,R.J., Winkler,H.H. (1975), J.Bacteriol. 123:985-991

39. Kadner,R.J., McElhaney,G. (1978), J.Bacteriol. 134:1020-1029

40. Kang,S.Y. (1978), J.Bacteriol. 136:867-873

41. Kanner,B.I., Gutnick,D.L. (1972), J.Bacteriol. 111:287-289

42. Kayama,Y., Kawasaki,T. (1976), J.Bacteriol. 128:157-164

43. Kielley,W.W. (1963), Meth.Enzymol. VI:272-277

44. Kinzel,H. (1977), "Grundlagen der Stoffwechselphysiologie", S.175, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, (UTB 618)

45. Klein,W.L., Boyer,P.D. (1972), J.Biol.Chem. 247:7257-7265

46. Kobayashi,H., Kin,E., Anraku,Y. (1974), J.Biochem. 76:251-261

47. Lehninger,A.L. (1970), "Biochemistry", Worth Publishers Inc., New York

48. Leong,J., Neilands,J.B. (1976), J.Bacteriol. 126:823-830

49. Lessler,M.A. (1969), "Oxygen Electrode Measurements in Biochemical Analysis" aus "Methods of Biochemical Analysis" Bd.17, Intersciencs Publishers New York, D.Glick (Hrsg.), S.1-29

50. Liberman,Y.N., Mokhova,Y.N., Skulachev,V.P., Topaly,V.P. (1968), Biophysics 13:226-232

51. Lieberman,M.A., Hong,J. (1976), Arch.Biochem.Biophys. 172:312-315

52. Mahler,H.R., Cordes,E.H. (1971), "Biological Chemistry", Harper and Row Publishers, New York

53. Mitchell, P. (1970), Symp.Soc.Gen.Microbiol.20th 20:121-166

54. Naegeli,H.-U. (1978), "Synthetische Modelle für den Antagonismus zwischen Sideromycinen und Sideraminen", Dissertation 6232, ETH Zürich

55. Norrestam,R., Stensland,B., Brändén,C.-I. (1975), J.Mol.Biol. 99:501-506

56. Ohki,R. (1975), J.Bacteriol. 123:815-823

57. Plate,C.A. (1979), J.Bacteriol. 137:221-225

58. Pugsley,A.P., Reeves,P. (1977), J.Bacteriol. 130:26-36

59. Rainnie,D.J., Bragg,P.D. (1973), J.Gen.Microbiol. 77:339-349

60. Ramos,S., Schuldiner,S., Kaback,H.R. (1976), Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73:1892-1896

61. Rhoads,D.B., Epstein,W. (1977), J.Biol.Chem. 252:1394-1401

62. Rinehart,C.A., Hubbard,J.S. (1976), J.Bacteriol. 127:1255-1264

63. Romslo,I., Flatmark,T. (1975), Biochimica et Biophysica Acta 387:80-94

64. Simoni,R.D., Postma,P.W. (1975), Ann.Rev.Biochem. 44:523-554

65. Sprott,G.D., Dimock,K., Martin,W.G., Schneider,H. (1975), J.Bacteriol. 123:828-836

66. Strehler,B.L. (1970), "Adenosin-5'-Triphosphat und Creatinphosphat, Bestimmung mit Luciferase" aus "Methoden der enzymatischen Analyse", 2.Aufl., Bd.II, Bergmeyer,H.U. (Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim, S.2036-2050

67. Subcommittee on Iron, Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants, Division of Medical Sciences, Assembly of Life Sciences, National Research Council (1979), "Microorganisms and Iron" aus "Iron", University Park Press, Baltimore, S.39-56

68. Tokuda,H., Konisky,J. (1978), Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75:2579-2583

69. Wagegg,W. (1979), persönliche Mitteilung

70. Weiss,M.J., Luria,S.E. (1978), Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75:2483-2487

71. Winkelmann,G. (1979), FEBS Lett. 97:43-46

72. Winkler,H.H. (1973), J.Bacteriol. 116:203-209

73. Wood,J.M. (1975), J.Biol.Chem. 250:4477-4485

74. Wookey,P.J. (1979), persönliche Mitteilung

LEBENSLAUF

28.12.1949	geboren in Eßlingen/Neckar
April 1956 - April 1960	Grundschule in Eßlingen-Pliensauvorstadt
April 1960 - Juni 1968	Schelztor-Gymnasium Eßlingen
Juni 1968	Abitur am Schelztor-Gymnasium
Juli 1968 - Dezember 1969	Wehrdienst in Bruchsal und Sonthofen
WS 1969/70 - SS 1973	Studium der Chemie an der Universität Stuttgart
Juli 1972	Diplomvorprüfung in Chemie
Juli 1973 - September 1975	Studium der Biochemie an der State University of New York at Buffalo
September 1975	Abschluß des Biochemie-Studiums in Buffalo mit dem Titel "Master of Arts"
WS 1975/76 - SS 1976	Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
Juni 1976	Diplomprüfung in Biochemie
WS 1976/77 - SS 1979	Promotion an der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen, Lehrstuhl Mikrobiologie II (Prof. Dr. V.Braun)

Meine akademischen Lehrer waren

an der Universität Stuttgart:

E.Allenstein, H.Bredereck, F.Effenberger, E.Fluck, T.Förster, H.Krebs, W.Haubold, H.Preuss

an der State University of New York at Buffalo:

O.P.Bahl, E.A.Barnard, C.Coutsogeorgopoulos, M.Derechin, W.B.Elliott, M.J.Ettinger, M.Garrick, J.Klingman, D.J.Kosman, E.J.Massaro, R.H.McMenamy, M.Meisler, R.Noble, P.D.Papahadjopoulos

an der Freien Universität Berlin:

J.Ahlers, E.-R.Lochmann, U.Reichert

an der Universität Tübingen:

K.Altendorf, V.Braun, G.Winkelmann

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545 /8791